

Tesis de Posgrado

Uso de ácidos biliares como precursores sintéticos de pregnanos con aplicación en el estudio del mecanismo de hidroxilación biológica en Carbono 14 de cardenólidos

Deluca, Mónica Eva

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Deluca, Mónica Eva. (1985). Uso de ácidos biliares como precursores sintéticos de pregnanos con aplicación en el estudio del mecanismo de hidroxilación biológica en Carbono 14 de cardenólidos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1905_Deluca.pdf

Cita tipo Chicago:

Deluca, Mónica Eva. "Uso de ácidos biliares como precursores sintéticos de pregnanos con aplicación en el estudio del mecanismo de hidroxilación biológica en Carbono 14 de cardenólidos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1905_Deluca.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"USO DE ACIDOS BILIARES COMO PRECURSORES SINTETICOS DE
PREGNANOS CON APLICACION EN EL ESTUDIO DEL MECANISMO DE
HIDROXILACION BIOLOGICA EN CARBONO 14 DE CARDENOLIDOS"

Directora de Tesis
Dra. Alicia M. Seldes

Lugar de Trabajo
Departamento de Química Orgánica

MONICA EVA DELUCA
Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR EN QUIMICA
- 1985 -

Rra.

★
Besis 1905

ej. 2

*Para Hugo y mis padres
con profundo cariño
y cada día por más razones*

Deseo expresar mi gratitud
a la Dra. Alicia M. Seldes, directora de
esta tesis, por su empeño en mi formación
científica y su permanente afecto.

Agradezco además:

A UMYMFOR (CONICET-FCEN) por la realización de las determinaciones instrumentales:

Dr. Gerardo Burton y Sr. Carlos G. Arabehty por los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C .

Sr. Jorge A. Aznárez por los espectros de masa.

Lic. Juan B. Rodríguez por las cromatografías líquido-líquido de alta resolución.

Al Dr. Eduardo G. Gros y al Dr. Gerardo Burton por el apoyo brindado.

Al Dr. Carlos P. Lantos (Dto. Química Biológica, FCEN, UBA) por el uso del contador de centelleo líquido Tracor Analytic Mark III.

Al Dr. I. Mizrahi (INTA, Castelar), por las semillas de *D. purpurea*.

A los Licenciados Darío Doller, Enrique Hughes y Jorge Palermo por su amistad, confianza y desinteresada colaboración.

A mis compañeros de laboratorio: Dra. Marta Maier, Lic. Marta Romero, Lic. Patricia Eisenberg, Srta. Alicia Arenaza y Lic. Jorge Palermo por sus buenos consejos y su ayuda diaria.

A mis compañeros del Departamento de Química Orgánica por su constante cordialidad.

INDICE

	pág.
Introducción.....	1
Objetivos.....	28
Descripción de la labor realizada.	
Síntesis de $[21-^{14}\text{C}]$ 3β -hidroxi- 5β -pregn-8(14)-en-20-ona y de	
$[21-^{14}\text{C}]$ 3β -hidroxi- 5β -pregnan-20-ona a partir de ácidos biliares.....	37
Inoculación de los productos radiactivos a plantas de <i>D. purpurea</i>	91
Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C aplicada a	
derivados 5β -esteroidales.....	96
Descripción y discusión de los resultados obtenidos en los estudios	
biosintéticos.....	103
Descripción y discusión de los resultados obtenidos en RMN- ^{13}C	115
Experimental.....	150
Resumen.....	204
Bibliografía.....	206
Indice de figuras.....	213
Indice de tablas.....	213

ABREVIATURAS USADAS

Ac : acetilo

c_{AB} : cuarteto AB

CL : cadena lateral

DMF : dimetilformamida

Hz : hertz

NLED : N-litioetilendiamina

Suc : succinilo

Ts : *p*-toluensulfonilo

ClTs : cloruro de *p*-toluensulfonilo

TsOH : ácido *p*-toluensulfónico

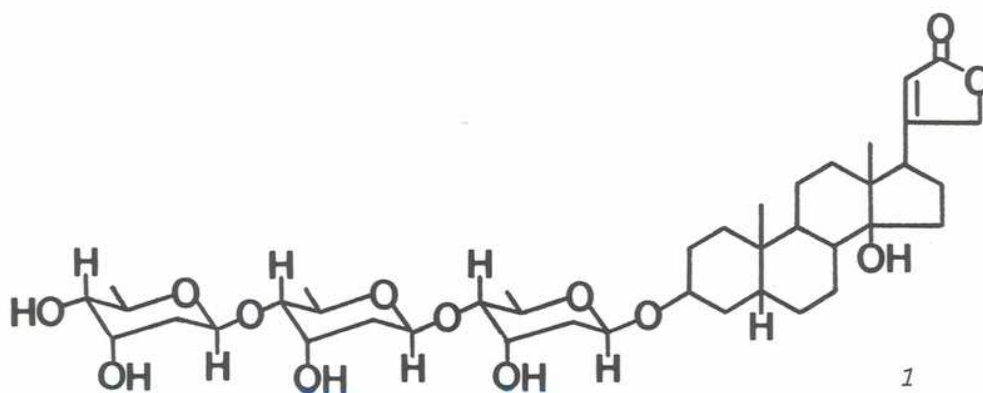
INTRODUCCION

Los esteroides que en humanos y animales tienen la propiedad de ejercer una acción específica y eficaz sobre el músculo cardíaco se describen como principios cardioactivos o cardiotónicos. En ciertos casos de enfermedades cardíacas una muy pequeña cantidad puede producir una estimulación beneficiosa pues aumenta la contractibilidad del músculo y disminuye la frecuencia de dichas contracciones, lo que se traduce en una mayor eficiencia. Sin embargo una dosis excesiva causa la muerte.

La mayoría de los miembros del grupo son glicósidos de origen vegetal. Una hidrólisis separa la porción glicosídica y libera la genina o aglicona esteroi-
dal.

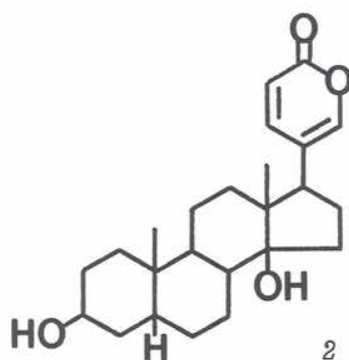
Las geninas pueden ser de dos tipos conocidos como cardenólidos y bufadienólidos.

Los cardenólidos, como por ejemplo la digitoxina (1), son esteroides de veintitrés átomos de carbono que tienen como cadena lateral un anillo lactónico de cinco miembros α,β -insaturado (anillo butenólido)



La estereoquímica del sistema de anillos corresponde invariablemente a la de un ácido biliar en los carbonos 8, 9, 10, 13 y 17 pero con unión *cis* entre los anillos C y D y una función oxigenada en carbono 14 con orientación β (hidroxilo o epóxido). Se han aislado también 5α y Δ^5 -derivados¹.

Los bufadienólidos son esteroides de veinticuatro átomos de carbono cuya cadena lateral es un anillo lactónico de seis miembros doblemente insaturado (α -pirona). Estos compuestos, como por ejemplo la bufalina (2), también tienen un hidroxilo en posición 14 o un epóxido entre los carbonos 14 y 15, en ambos casos con configuración β , y una unión *cis* entre los anillos A y B.



Todos los cardenólidos existen como glicósidos vegetales, pero los bufadienólidos son productos que se encuentran tanto en el reino vegetal como animal y se presentan en forma glicosídica o bien como agliconas.

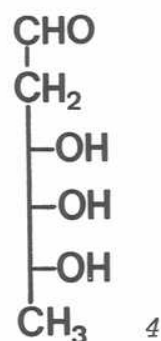
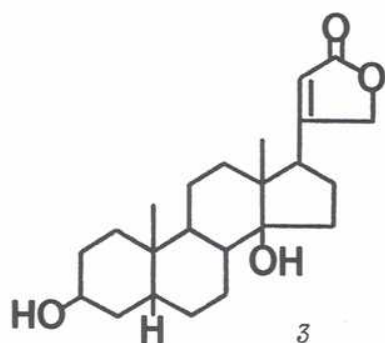
Aunque la actividad biológica descrita de un glicósido reside en la aglicona, el hidrato de carbono le confiere mayor solubilidad en agua y una mayor difusión a través de membranas semipermeables. Es por ello que las agliconas libres son menos potentes que sus derivados glicosidados. Esto no ocurre con los

venenos de sapos, donde las geninas esteroidales libres son más potentes que cuando se las encuentra como ésteres de la suberilarginina.

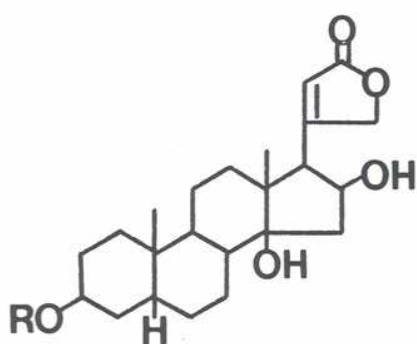
Las plantas del género *Digitalis*, particularmente la *D. purpurea*, se usó para la preparación de veneno para las pruebas medievales de ordalía. El empleo de preparados de *Digitalis* en la terapia cardíaca fue introducido en 1785 por William Withering con un éxito espectacular.

Las *Digitalis* son plantas bianuales de uno a dos metros de altura, que pertenecen a la familia de las *Escrofulariáceas*. Sus flores se disponen en espigas que en algunos casos miden más de 50 cm de largo. Debido a la semejanza de las flores con los dedos que se utilizan para coser se las conoce vulgarmente con el nombre de "dedalera". Se encuentran principalmente en Europa central y en el área del Mediterráneo. En nuestro país se puede ubicar la *D. purpurea* en la zona cordillerana comprendida entre el lago Nahuel Huapi y el lago Argentino y procede de los cultivos hechos por los jesuitas a fines del siglo XVII. Esta planta y la *D. lanata* son las utilizadas casi exclusivamente para la obtención de los glicósidos puros para usos medicinales.

Las investigaciones químicas de las sustancias cardioactivas de *D. purpurea* comenzaron en Francia en el siglo XIX. Recién en 1869 Nativelle² obtuvo un compuesto cristalino que luego se conoció como digitoxina. Su estudio químico y farmacológico se inició en el siglo XX por Cloetta³ y Windaus⁴. Una hidrólisis ácida de digitoxina rindió la aglicona digitoxigenina (3) y tres moléculas de digitoxosa (2,6-didesoxi-D-ribo-hexosa)(4).

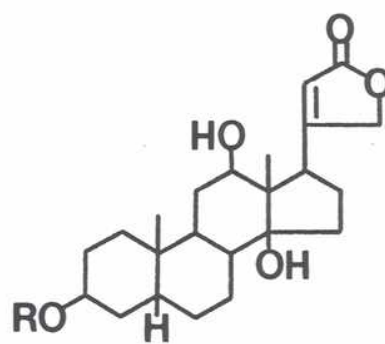


Posteriormente, Windaus⁵ y Kraft⁶ aislaron gitoxina (5) de *D. purpurea* y en 1930 Smith⁷ obtuvo digoxina (6) de *D. lanata*.



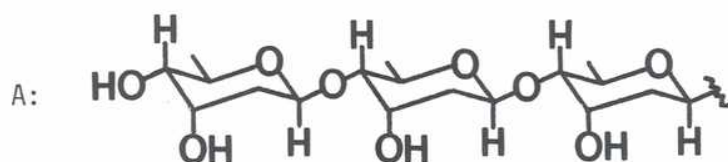
R = A 5

R = H 8



R = A 6

R = H 7



Los tres glicósidos (digitoxina, digoxina y gitoxina) tienen estructura anular similar y están unidos a un trisacárido constituido por tres moléculas de digitoxosa a través del carbono 3 de las respectivas agliconas (digitoxigenina (3),

digoxigenina (7) y gitoxigenina (8)).

Si bien estos tres glicósidos descriptos resultan ser los mayoritarios en plantas de *Digitalis*, posteriormente fueron aislados de las mismas otros compuestos cardiotónicos⁸ minoritarios.

BIOSINTESIS DE CARDENÓLIDOS. ANTECEDENTES.

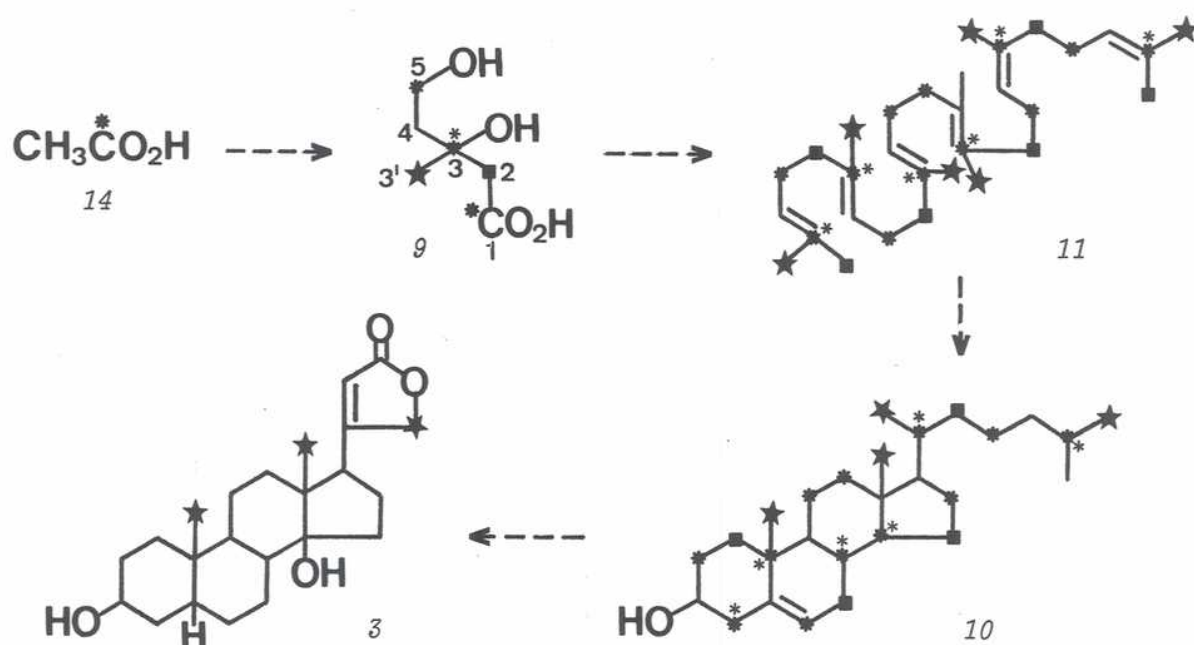
La biosíntesis de cardenólidos ha sido investigada utilizando plantas del género *Digitalis*, en particular *D. lanata* y *D. purpurea*. Se realizaron además algunos estudios complementarios en *Strophantus kombé*.

La estructura esteroidal de los cardenólidos sugiere que su biogénesis puede estar íntimamente relacionada con la de los esteroides, existiendo una diferencia estructural importante entre ambos y que consiste en que la cadena lateral alifática de los esteroides ha sido reemplazada por un grupo butenólido.

Dado que el ácido mevalónico (9) ha sido reconocido como precursor del colesterol (10)⁹ en experiencias realizadas con tejido animal, Ramstadt y Beal¹⁰ iniciaron los estudios intentando establecer si en el caso de compuestos esteroideos de origen vegetal el camino biosintético era similar al encontrado en animales. Para ello probaron la función que podría tener el ácido mevalónico en la biosíntesis de glicósidos cardiotónicos suministrando [2-¹⁴C] ácido mevalónico a plantas de *D. lanata*. Después de un período de tiempo adecuado, los autores aislaron un glicósido radiactivo cuya hidrólisis producía digitoxigenina (3) radiactiva e hidratos de carbono no radiactivos, lo que confirmaba el carácter precursor del ácido mevalónico de la porción esteroidal de estos compuestos.

Debido a que en animales estaba bien establecido que el colesterol se formaba por ciclación del escualeno (11) y que éste derivaba de seis moléculas de ácido mevalónico, Leete y colaboradores^{11,12} asumieron como hipótesis de trabajo

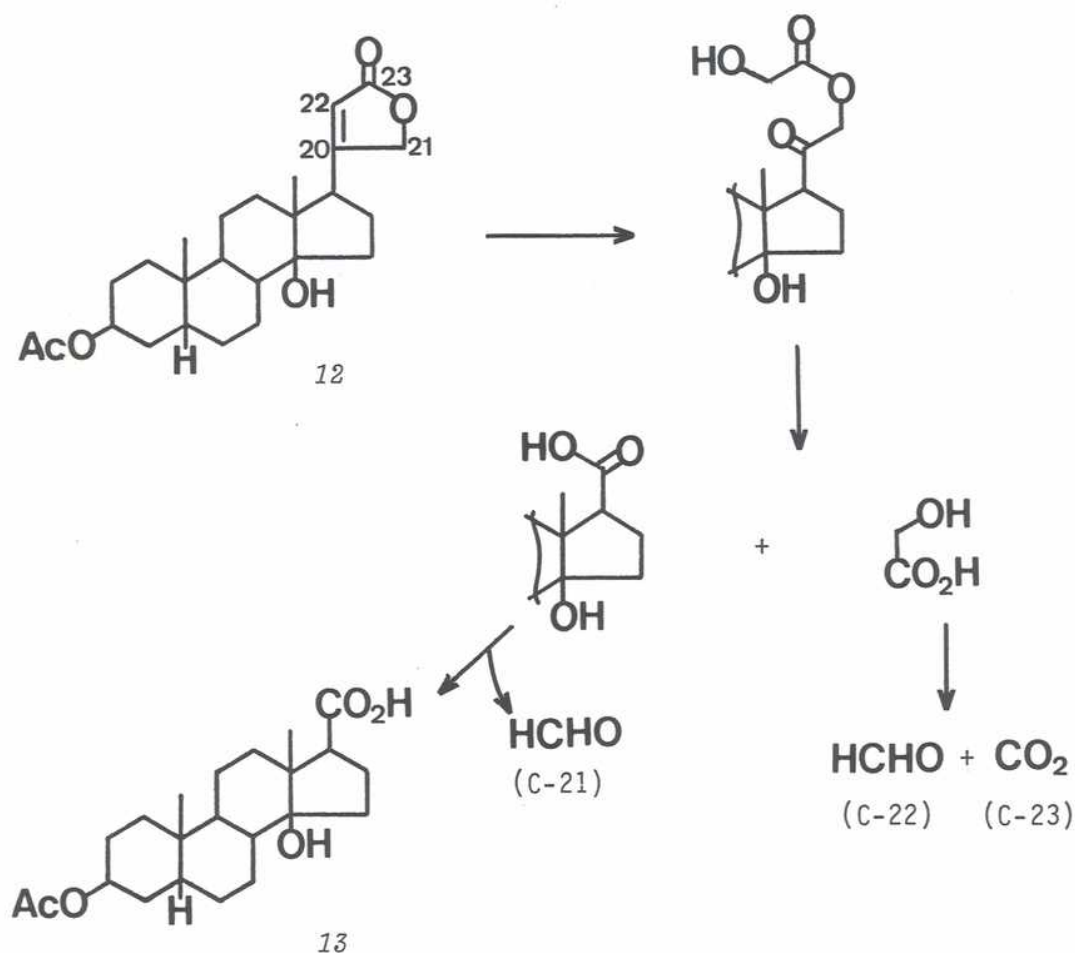
que los cardenólidos se podrían formar en las plantas por una secuencia análoga de reacciones. De ser así, el $[2-^{14}\text{C}]$ ácido mevalónico produciría digitoxigenina marcada en los carbonos 1, 7, 15 y 22 (esquema 1), considerando que el anillo butenólido derivara de la cadena lateral de un esteroide o triterpeno estrechamente relacionado con el colesterol, por ruptura de la misma entre los carbonos 23 y 24.



Esquema 1: Hipótesis sobre la distribución de la marcación en digitoxigenina a partir de ácido mevalónico o ácido acético.

Para comprobar esta hipótesis fueron inoculados ejemplares de *D. purpurea* con $[2-^{14}\text{C}]$ ácido mevalónico, aislando posteriormente la digitoxina proveniente de la experiencia. El glicósido fue hidrolizado y acetilado obteniéndose

acetildigitoxigenina (12) que fue sometida a una ozonólisis reductiva y posterior degradación tal como se indica en el esquema 2.

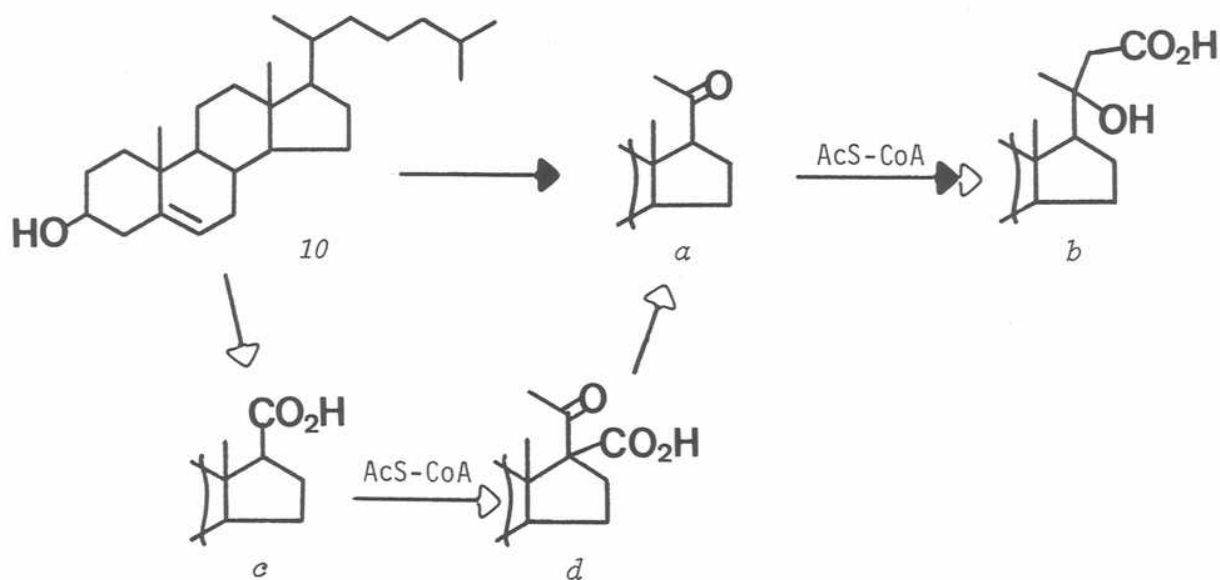


Esquema 2: Degradación del anillo butenólido de la digitoxigenina.

Con este procedimiento los autores pudieron verificar que el ácido 3 β -acetoxi-14 β -hidroxi-5 β -androstán-17 β -carboxílico (13) presentaba la misma actividad específica que la acetil digitoxigenina de partida, lo que indicó que los carbonos 21, 22 y 23 que forman parte del anillo butenólido no poseían radiactividad. La reacción de Schmidt sobre el ácido etiánico anterior (13) rindió dióxido de

carbono no radiactivo, lo cual indicó que no había actividad en el carbono 20.

Este resultado hizo resurgir dos antiguas teorías^{13,14} que sugerían que el anillo butenólido se formaba a partir de una o dos moléculas de ácido acético, probablemente activadas como acetil coenzima A, según se indica en el esquema 3.



Esquema 3: Teorías sobre la formación del anillo butenólido.



Teoría A



Teoría B

Teoría A: ruptura de la cadena lateral del colesterol entre los carbonos 20 y 22 para dar un 20-ceto derivado (a) que reaccionaría con una molécula de acetato dando un β-hidroxiácido (b).

Teoría B: ruptura de la cadena lateral del colesterol entre los carbonos 17 y 20 dando un ácido etiánico (c) que con una molécula de acetato daría un β-cetoácido (d) que por descarboxilación formaría un 20-ceto pregnano

(a) que reaccionaría como se indicó anteriormente.

Por ello Leete y colaboradores¹² inocularon $|1-^{14}\text{C}|$ acetato de sodio (14) a plantas de *D. purpurea* y aislaron digitoxina radiactiva (ver esquema 1) que degradaron como se indica en el esquema 2. En este caso el anillo butenólido presentaba un significativo valor de radiactividad que estaba localizada en los carbonos 20 y 23, mientras que los carbonos 21 y 22 resultaron esencialmente inactivos.

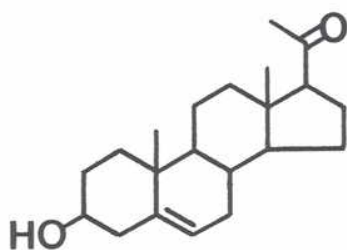
Sin embargo el origen del anillo lactónico no estaba aún aclarado pues el resultado anterior no permitía descartar ninguna de las dos teorías antes propuestas. Para llegar a esclarecer cuál de los dos caminos era el que realmente seguía el proceso biosintético inyectaron plantas de *D. purpurea* con $|3'-^{14}\text{C}|$ ácido mevalónico. Un pregnano formado a partir de este ácido resultaría marcado solamente en las posiciones 18, 19 y 21 (indicado con ★ en las fórmulas del esquema 1). Como era previsible la digitoxina aislada dos semanas después era radiactiva. Los estudios de degradación indicaron que la tercera parte de la actividad estaba localizada en el carbono 21, lo que descartaba la posibilidad de un ácido etiánico como intermediario en el proceso en estudio. De esta manera quedaba eliminada la teoría que postulaba la ruptura entre los carbonos 17 y 20 del colesterol.

Finalmente Gros y Leete¹⁵ degradaron completamente la digitoxigenina aislada luego de una incubación con $|2-^{14}\text{C}|$ ácido mevalónico en plantas de *D. purpu-*

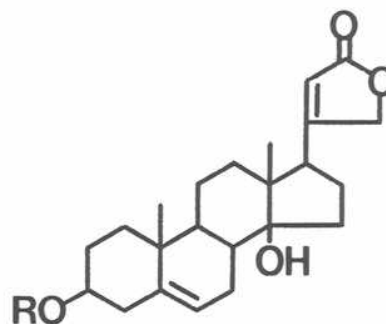
rea. Encontraron que las marcaciones estaban exclusivamente localizadas en los carbonos 1, 7 y 15 (ver esquema 1) y que la radiactividad estaba igualmente dividida entre esos carbonos.

Estos resultados llevaron a proponer que los esteroides de plantas se biosintetizan a partir de escualeno siguiendo la misma serie de reacciones metabólicas que aquellas que conducen a esteroides animales como el colesterol.

Las conclusiones anteriores se confirmaron por una parte con la experiencia realizada por Tschesche y Lilienweiss¹⁶ quienes administraron el 3 β -glucósido de la [21-¹⁴C] 3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (pregnenolona) (15)* a plantas de *D. lanata*. Estos investigadores encontraron que el 6% de la actividad suministrada estaba en los glicósidos cardenólidos digitoxina, gitoxina, digoxina y xysmalona (16).



15



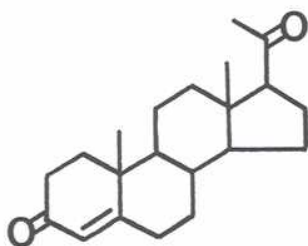
16

* Los compuestos mencionados llevan un número correspondiente a su estructura sin marcación isotópica. La misma se indica en cada caso en particular.

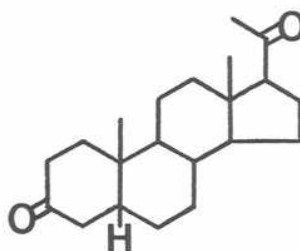
Por otro lado, Reichstein y colaboradores¹⁷ rociaron $[3-^{14}\text{C}]$ ácido mevalónico en hojas de *D. lanata*. La digitoxina aislada de las mismas se hidrolizó y la aglicona se degradó según un esquema similar al esquema 2, resultando marcada en el carbono 20 además del sistema esteroideal. Finalmente Tschesche y Brassat¹⁸ determinaron que $[21-^{14}\text{C}]$ pregnenolona presentaba incorporación en los cardenólidos.

En 1966 Caspi y colaboradores¹⁹ inyectaron $[4-^{14}\text{C}]$ colesterol a plantas de *D. lanata* y aislaron entre los metabolitos pregnenolona radiactiva, demostrando así la capacidad de las plantas de metabolizar colesterol.

En ese momento, uno de los mecanismos que faltaba esclarecer era el de la hidrogenación estereoespecífica del doble enlace de la posición 5 conducente a un sistema A/B *cis*. Una idea expuesta por Caspi y Lewis²⁰ sugería que la saturación del alcohol homoalílico (3β -hidroxi- Δ^5) para rendir 5β -pregnanolona podía proceder mediante una oxidación e isomerización a una Δ^4 -3-cetona que posteriormente se reduciría mediante una *cis* adición de hidrógeno por la cara α del sistema. La evidencia en la que se apoyaban era que dado que el colesterol se transformaba en pregnenolona, esta última debía tener en la biosíntesis de glucósidos cardiotónicos en plantas un rol análogo al que tiene en la formación de hormonas esteroideas en animales. Por ello Heftmann y colaboradores^{21,22} hicieron un estudio de los metabolitos radiactivos aislados luego de la incubación de $[4-^{14}\text{C}]$ pregnenolona en plantas de *D. lanata* pudiendo identificar pregn-4-en-3,20-diona (progesterona)(17) y 5β -pregnan-3,20-diona (18) radiactivas.



17



18

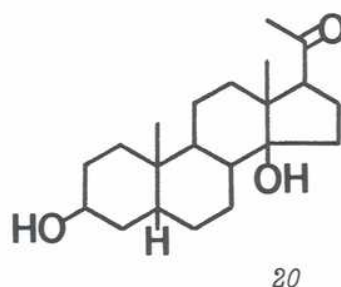
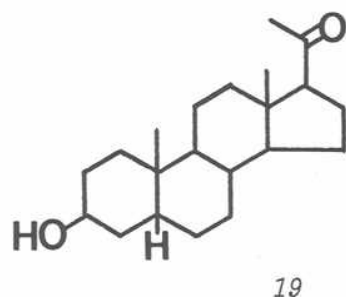
Este resultado los llevó a suministrar $[4-^{14}\text{C}]$ progesterona, encontrando con este compuesto una incorporación en cardenólidos diez veces mayor que en el caso anterior. Estos resultados demostraban que la progesterona era un precursor más avanzado en el camino biosintético hacia los glicósidos cardiotónicos. Al igual que en la oportunidad anterior en este caso también se aisló 5β -pregnan-3,20-diona radiactiva.

Para completar el problema de la saturación del doble enlace Caspi y Hornby²³ rociaron hojas de *D. lanata* con $[3\alpha-^3\text{H}, 4-^{14}\text{C}]$ pregnenolona. La digitoxina radiactiva aislada no contenía tritio lo que permitió concluir que un 3-ceto derivado era intermediario en la ruta biosintética de pregnenolona a cardenólidos.

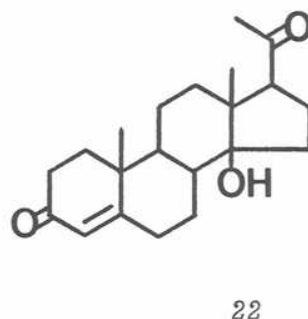
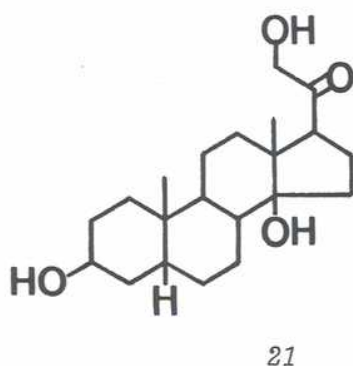
Posteriormente Tschesche y colaboradores²⁴ demostraron que la 3β -hidroxi- 5β -pregnan-20-ona (19) y la 5β -pregnan-3,20-diona eran precursores de digitoxina, digoxina y gitoxina en plantas de *D. lanata*.

En 1967 Tschesche, Hulpke y Scholten²⁵ trataron de acotar la etapa del camino biosintético en que se produce la hidroxilación. Supusieron que podría

realizarse sobre esteroides del tipo 20-ceto pregnano, pero también existía la posibilidad de que fuese posterior a la construcción del anillo lactónico. Para aclarar este punto suministraron $[15,16-^3\text{H}_2]$ $3\beta,14\beta$ -dihidroxi-5 β -pregnan-20-ona (20) a hojas cortadas de *D. lanata* y aislaron de las mismas digitoxina radiactiva. Este hecho permitió deducir que la hidroxilación en carbono 14 ocurre antes que la formación del anillo butenólido.



Una vez aclarada esta etapa se sospechó que para la unión de los dos átomos de carbono requeridos para la construcción del anillo lactónico era necesaria una hidroxilación en carbono 21. Con el fin de comprobarlo Tschesche, Becker y Hombach²⁶ sintetizaron $[3-^3\text{H}]$ $3\beta,14\beta,21$ -trihidroxi-5 β -pregnan-20-ona (21) y probaron su comportamiento como precursor de cardenólidos en plantas de *D. lanata*.



En esta experiencia aislaron cardenólidos radiactivos, quedando de esta manera confirmada su participación como precursor.

Por otro lado, teniendo en cuenta el contenido radiactivo de las agliconas esteroideas aisladas luego de la inoculación con $[22-^{14}\text{C}]$ digitoxigenina se determinó que esta última se hidroxilaba en posición 12β para rendir digoxigenina, pero la hidroxilación en carbono 16 para formar gitoxigenina se producía en pequeña proporción.

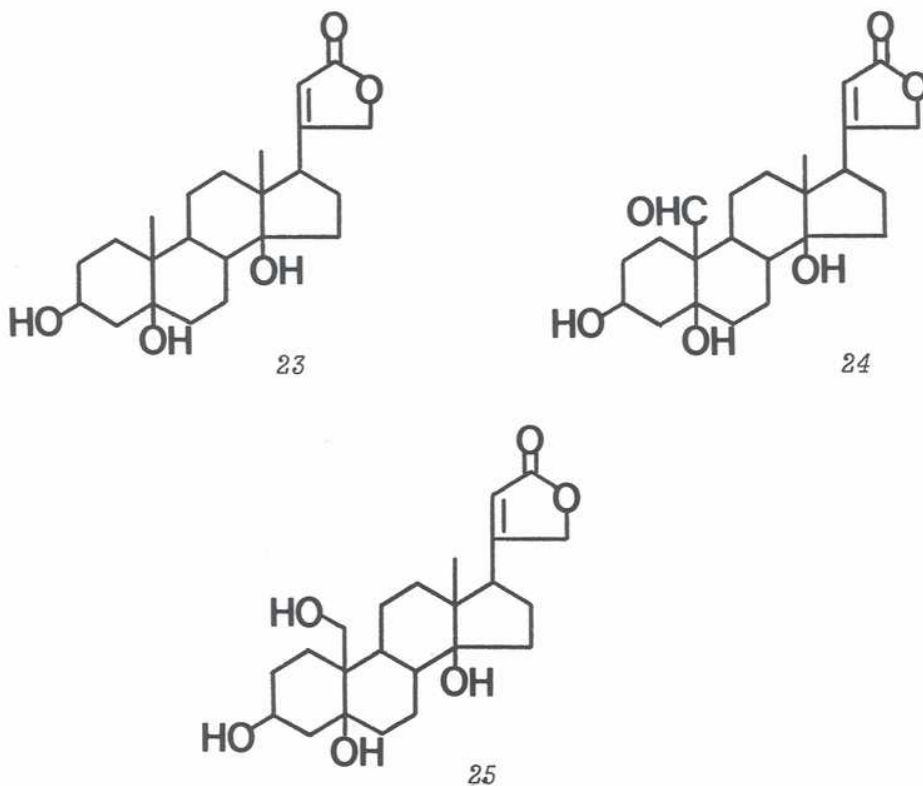
En experiencias posteriores²⁷ se demostró que por administración de 14β -hidroxiprogesterona (22) a plantas de *D. lanata* se obtiene un alto rendimiento de gitoxigenina pero bajo de digoxigenina.

Este conjunto de datos permitió suponer que la digoxigenina se forma primordialmente por hidroxilación de digitoxigenina. Por otro lado gitoxigenina se biosintetiza mediante dos caminos alternativos: uno por hidroxilación en carbono 16 de digitoxigenina y el otro a través de la hidroxilación en carbono 16 de un pregnano.

Paralelamente con estas experiencias Heftmann y colaboradores²⁸ estudiaron la biosíntesis de glicósidos cardiotónicos en plantas del género *Strophanthus* cuyos cardenólidos difieren de los encontrados en *Digitalis* por presentar funciones oxigenadas en la posición 5.

El objetivo inicial fue determinar si los primeros pasos del camino biosintético eran los mismos en las dos especies. Para ello administraron $[4-^{14}\text{C}]$ pro-

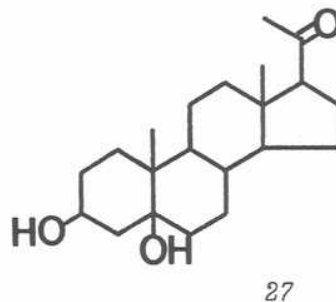
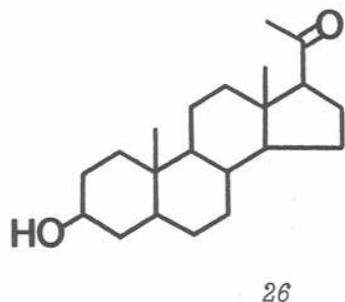
gesterona (17) a hojas de *S. kombé* y aislaron luego de una hidrólisis periplogénica (23), estrofantidina (24) y estrofantidol (25) radiactivas.



Dado que, en animales la transformación de Δ^5 -esteroides en análogos saturados 5α o 5β procede vía un Δ^4 -3-ceto intermediario, no resultaba sorprendente que progesterona fuese intermediario en la biosíntesis de cardenólidos en plantas de *Digitalis*. Pero los cardenólidos de *Strophanthus* son esteroides 5β -hidroxilados que no se presentan en animales. Según los autores, este resultado indica que una Δ^4 -3-cetona, en este caso progesterona, es también un intermediario obligatorio de 3,5-dioles. De ello concluyeron que la biosíntesis de estos glicósidos en *Digitalis* y en *Strophanthus* procede aparentemente a través de los

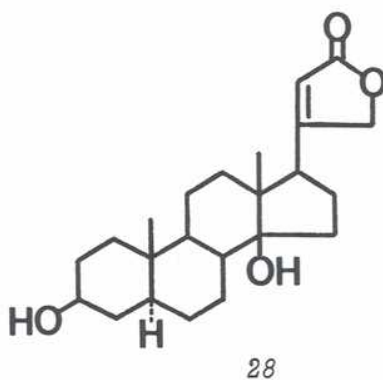
mismos intermediarios hasta la saturación del doble enlace.

En experiencias posteriores^{29,30} utilizando el mismo precursor, $[4-^{14}\text{C}]$ progesterona, aislaron 5β -pregnan-3,20-diona (18), 3β -hidroxi- 5α -pregnan-20-ona (26), $3\beta,5\beta$ -dihidroxipregnan-20-ona (27) y 3β -hidroxi- 5β -pregnan-20-ona (19) radiactivas.



Resultó especialmente sorprendente encontrar esteroides 5α en *S. kombé* ya que estos no se habían detectado anteriormente. Es por ello que los autores suministraron $[4-^{14}\text{C}]$ 3β -hidroxi- 5α -pregnan-20-ona (26) y $[4-^{14}\text{C}]$ $3\beta,5\beta$ -dihidroxipregnan-20-ona (27) a plantas de esa especie. Así aislaron varios productos radiactivos, pero ninguno de ellos en cantidades apreciables. El único que pudieron identificar fue el cardenólido uzarigenina (28) que no había sido identificado previamente en *S. kombé* y se encontraba raramente en otras especies de *Strophanthus*^{1a}.

De esta manera se demostró la presencia de un cardenólido con un hidrógeno 5α en esta especie.



Los aspectos más importantes de la hidroxilación enzimática de carbonos secundarios no activados en núcleos esteroidales eran conocidos desde hacía varios años. En tejidos animales³¹, microorganismos³² y plantas³³ el hidroxilo entrante asumía la estereoquímica del hidrógeno saliente.

En contraste con esto, el mecanismo de hidroxilación de carbonos terciarios no activados no estaba claro y en algunos casos la hidroxilación ocurría con retención y en otros con inversión de la configuración.

De este modo, la conversión de colesterol (10) en 20(S)-colest-5-en-3 β ,20-diol (20 α -hidroxicolesterol) en tejido adrenal³⁴ y la 14 α -hidroxilación de esteroides de 19 y 21 átomos de carbono por microorganismos³⁵ son ejemplos de hidroxilación con retención de configuración.

En cambio, la introducción del hidroxilo 14 β en cardenólidos procede con inversión de configuración pues colesterol, pregnenolona y progesterona, que son precursores en su biosíntesis, presentan una unión *trans* entre los anillos C y D (H-14 α). En consecuencia, teniendo en cuenta este factor, si la hidroxilación

ocurriera por las vías conocidas debería esperarse un producto con un hidroxilo 14 α en lugar de 14 β . Dado que los resultados obtenidos no respondían a un camino de hidroxilación biológica normal, varios investigadores intentaron aclararlo.

Caspi y colaboradores³⁶ propusieron mecanismos que podrían explicar dicha hidroxilación (esquema 4). Su teoría se basaba en una hidroxilación inicial por el procedimiento convencional que introduciría un hidroxilo 14 α (a). La posibilidad de esta reacción se veía apoyada por el aislamiento de esteroides 14 α -hidroxilados de origen vegetal^{37,38}.

El hidroxilo 14 α se transformaría en un alcohol 14 β por un camino que se podría explicar por conceptos químicos. Propusieron para ello dos mecanismos, uno iónico y otro radicalario.

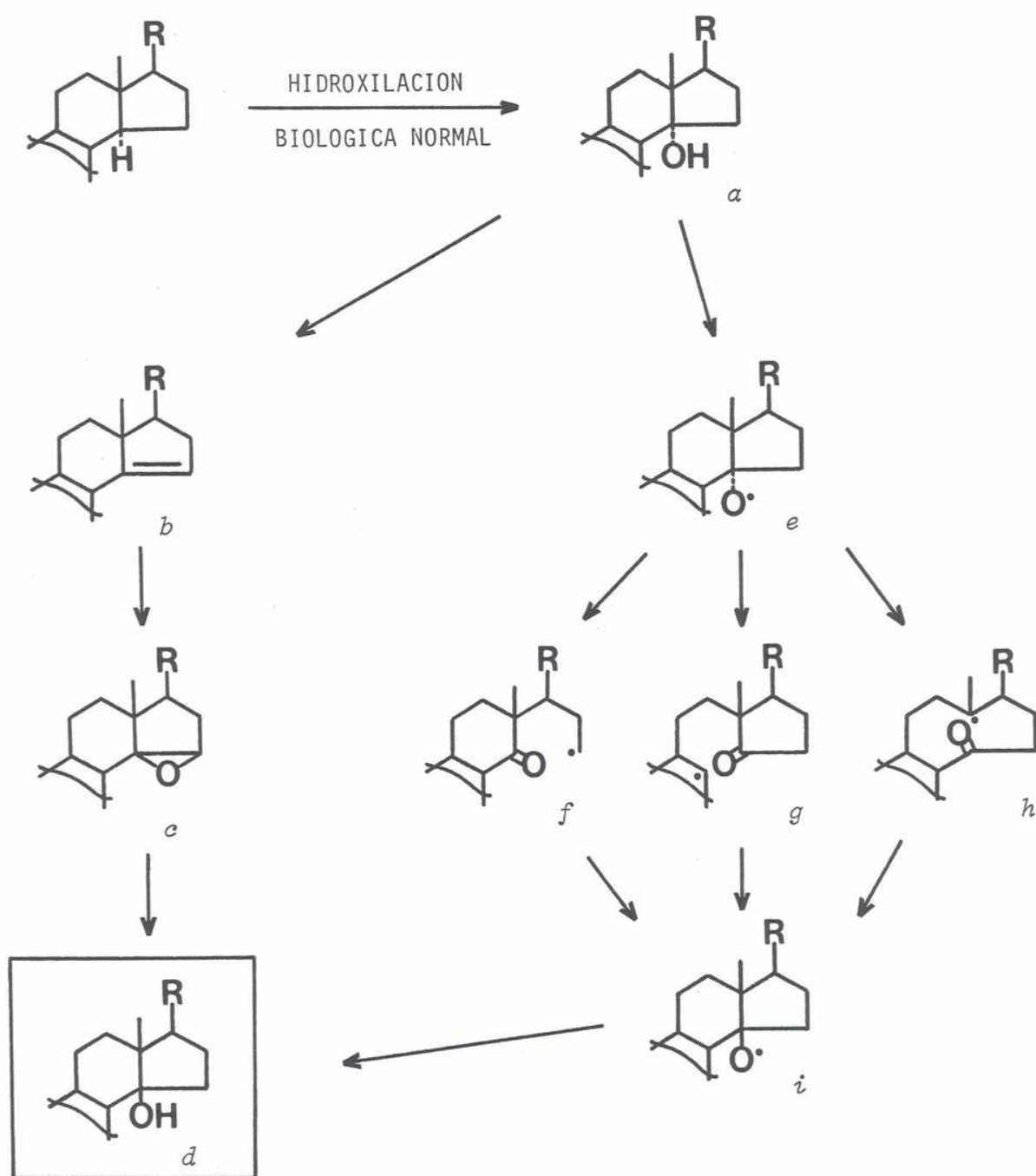
El mecanismo iónico consistía en la deshidratación del alcohol terciario con formación de un doble enlace 14(15) (b) que debido a una oxidación por la cara β de la molécula produciría un epóxido 14 β ,15 β (c). La presencia de epóxidos 14 β ,15 β en bufadienólidos respaldaría indirectamente este punto de vista.

Finalmente la apertura reductiva del epóxido por ataque al carbono 15 daría el alcohol 14 β (d).

Si la deshidratación del alcohol 14 α (a) conduce al doble enlace en posición 8(14) en lugar de 14(15) se podría aplicar el mismo razonamiento.

El segundo mecanismo era vía radicales libres y resultaba igualmente probable teniendo en cuenta que la biosíntesis de cardenólidos ocurre en las hojas^{16,18,20}.

Esquema 4: Teoría de Caspi sobre la hidroxilación 14 β .



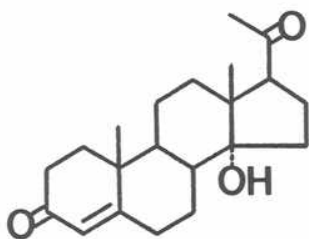
MECANISMO
IONICO

MECANISMO POR
RADICALES LIBRES

Bajo la influencia de la luz solar, el alcohol 14α podría producir un oxi-radical (*e*). Se sabe que estos radicales se reordenan dando ceto-radicales³⁹ de distinto tipo (*f*, *g*, *h*). El nuevo cierre del anillo podría ocurrir con inversión, para dar el oxi-radical 14β (*i*) y finalmente el alcohol (*d*).

La hidroxilación inicial no estaría limitada al carbono 14 y podría ocurrir en los carbonos 8 y 15. Estos compuestos se transformarían por mecanismos similares al descrito.

Para analizar las posibilidades planteadas se administró $[1-^3\text{H}]$ 14α -hidroxi- 5β -pregnan-3,20-diona (14α -hidroxiprogesterona) (*29*) junto con $[4-^{14}\text{C}]$ progesterona (*17*) a plantas de *D. lanata*, tratando de establecer si ambos isótopos o solamente el ^{14}C se incorporaban en digitoxina.



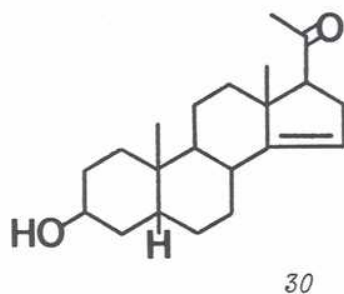
29

Una vez finalizado el ensayo la digitoxigenina aislada contenía ^{14}C pero no tritio, lo que indicó que el sustrato propuesto (*29*) no era intermediario.

De todas formas los autores pensaron que otro 14α -hidroxi intermediario podría estar involucrado en la formación de cardenólidos, por ejemplo en alguna etapa posterior de la biosíntesis.

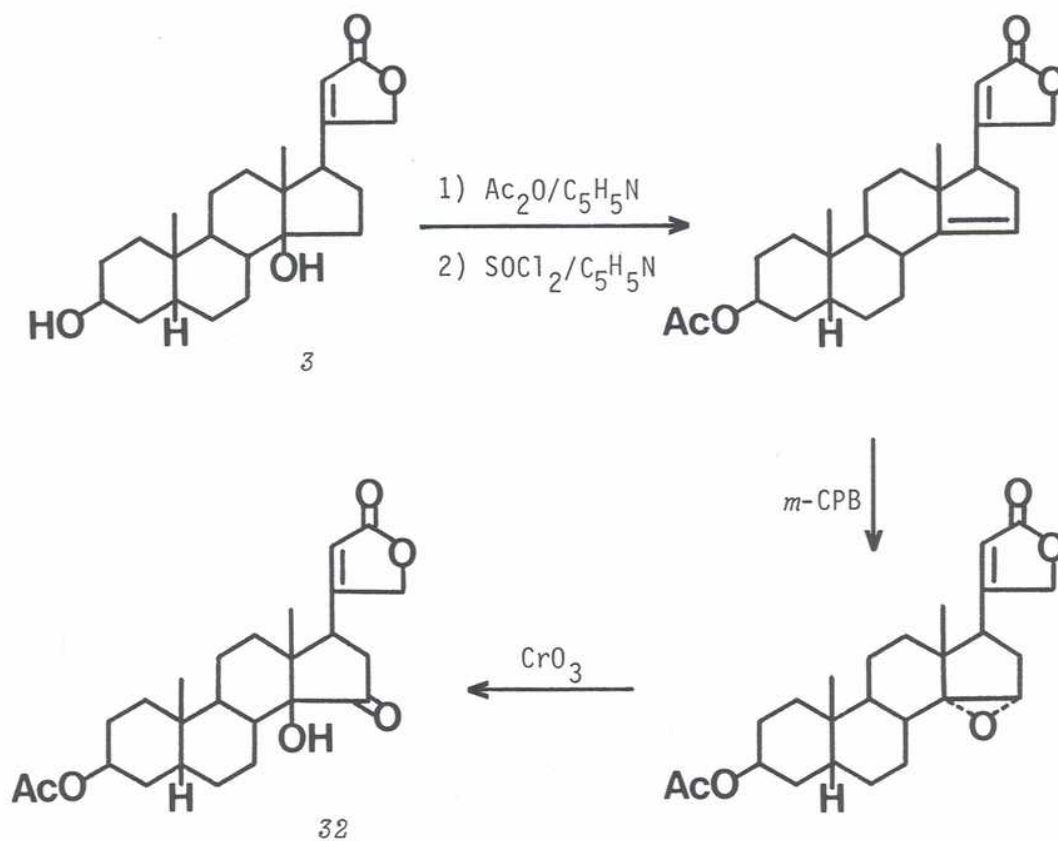
En 1970 Tschesche volvió a plantear la posibilidad de un intermediario con un doble enlace en posición 14²⁴. Esta idea había sido analizada por Caspi al proponer su mecanismo iónico, pero Tschesche supuso que la no incorporación de 14 α -hidroxiprogesterona (29) sólo descartaba una primera etapa de hidroxilación normal, pero no la participación de la mencionada olefina.

Suministró [16,17-³H₂] 3 β -hidroxi-5 β -pregn-14-en-20-ona (30) a plantas de *D. lanata*, pero el compuesto cardenólido aislado de las mismas no presentó radiactividad.



Este resultado complementó el trabajo realizado por Caspi.

Finalmente, Canónica y colaboradores⁴⁰ realizaron una experiencia que terminó de definir la no participación del carbono 15 en el proceso de hidroxilación. Administraron [2R-³H, 2-¹⁴C] ácido mevalónico (9) a plantas de *D. lanata*. Este compuesto debía originar en la planta un intermediario 15 α -tritio como se indica en el esquema 5. El hidrógeno 15 β del lanosterol (31) se retiene en la eliminación del metilo 14 α (j) y se invierte en la hidrogenación del doble enlace (k). Por lo tanto el último precursor debía originar en la planta progesterona o derivados de ésta con tritio en la posición 15 α .



Esquema 6: Transformación de digitoxigenina (3) en 3β-acetoxi-15-oxodigitoxigenina (32).

Para estudiar la posible participación del hidrógeno 15β se administró $[15\beta\text{-}^3\text{H}, 4\text{-}^{14}\text{C}]$ progesterona a plantas de *D. lanata*. Al aislarse la digitoxigenina se encontró que se mantenía la relación entre los isótopos y que por transformación en 3β-acetoxi-15-oxodigitoxigenina (esquema 6), se perdía el tritio casi totalmente. Esto indica que el hidrógeno 15β no participa en el proceso de hidroxilación en el carbono 14 a partir de progesterona.

Por último para confirmar los resultados suministraron a *D. lanata* $[15\alpha,15\beta,21,21,21-^3\text{H}_5, 4-^{14}\text{C}]$ pregnenolona. Dicho precursor administrado se equilibró con hidróxido de sodio en metanol acuoso para eliminar el tritio del carbono 21. El producto resultante presentó una relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ de 9,52.

La digitoxigenina aislada se degradó para obtener el ácido etiánico correspondiente que presentó una relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ de 9,52.

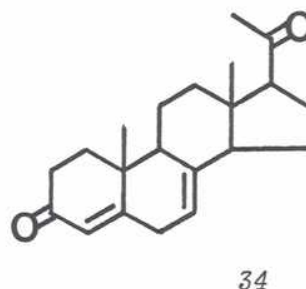
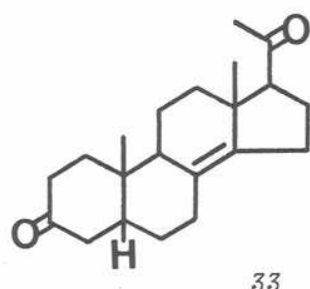
En consecuencia se puede concluir que los hidrógenos del carbono 15 no intervienen en el mecanismo de hidroxilación en el carbono 14 lo que excluye la participación de intermediarios con un hidroxilo, epóxido o doble enlace que involucre el carbono 15.

Posteriormente Caspi y colaboradores⁴¹ estudiaron la posible participación de una olefina (u olefinas) alrededor del carbono 8 y para ello suministraron $[8-^3\text{H}, 4-^{14}\text{C}]$ colesterol a plantas de *D. lanata*.

Los autores aislaron digitoxigenina y digoxigenina con la misma relación isotópica del precursor suministrado. De ello dedujeron que la introducción del hidroxilo ocurre sin pérdida del hidrógeno de carbono 8 de colesterol, quedando eliminadas con esta observación las olefinas planteadas como intermediarios, conclusión que es válida sólo si no hay migración de átomos de tritio durante el proceso biosintético.

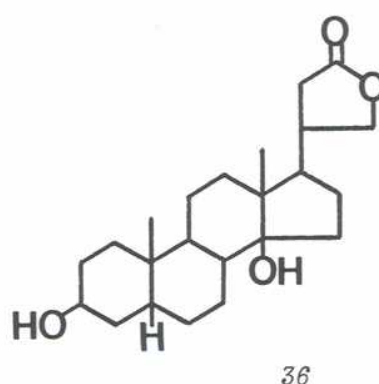
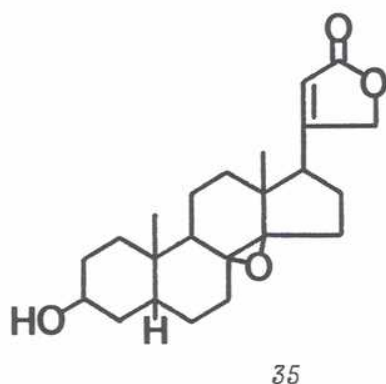
Sin embargo, paralelamente con estos trabajos Tschesche y Kleff⁴² supusieron que en el proceso de hidroxilación 14β podría participar un doble enlace 8(14).

Administraron $[7-^3\text{H}]$ 5 β -pregn-8(14)-en-3,20-diona (33), $[7-^3\text{H}]$ pregnenolona y $[6-^3\text{H}]$ 7-dehidroprogesterona (34) a plantas de *D. lanata*.



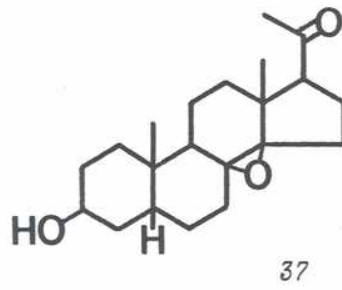
El aislamiento de los metabolitos de la planta y la caracterización de los mismos indicó que 5 β -pregn-8(14)-en-3,20-diona y pregnenolona son precursores de digitoxina mientras que la 7-dehidroprogesterona no lo es.

Los autores se preguntaron cómo podía el compuesto 33 transformarse en el derivado hidroxilado. Supusieron que una posibilidad era a través de un epóxido en posición 8(14). Esta suposición se veía respaldada porque la adinerigenina (35) (aglicona de un cardenólido minoritario de *Nerium oleander* L.) da por hidrogenación catalítica la dihidrodigitoxigenina (36).



De esta forma se produce una hidroxilación 14 β a partir de un epóxido 8(14) por un camino químico.

Como consecuencia del dato obtenido de incorporación del compuesto 33 Tschesche⁴³ desarrolló la síntesis del epóxido 37 a fin de confirmar su teoría, pero hasta el momento no han aparecido publicaciones sobre los resultados obtenidos por inoculación del mismo.



OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- ESTUDIO DE 3 β -HIDROXI-5 β -PREGN-8(14)-EN-20-ONA COMO PRECURSOR BIOSINTETICO DE GLICOSIDOS CARDENOLIDOS.
- SINTESIS DE [21-¹⁴C] 3 β -HIDROXI-5 β -PREGN-8(14)-EN-20-ONA Y DE [21-¹⁴C] 3 β -HIDROXI-5 β -PREGNAN-20-ONA A PARTIR DE ACIDOS BILIARES.
- ANALISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS POR ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE ¹³C PARA DIFERENTES DERIVADOS 5 β -ESTEROIDALES.

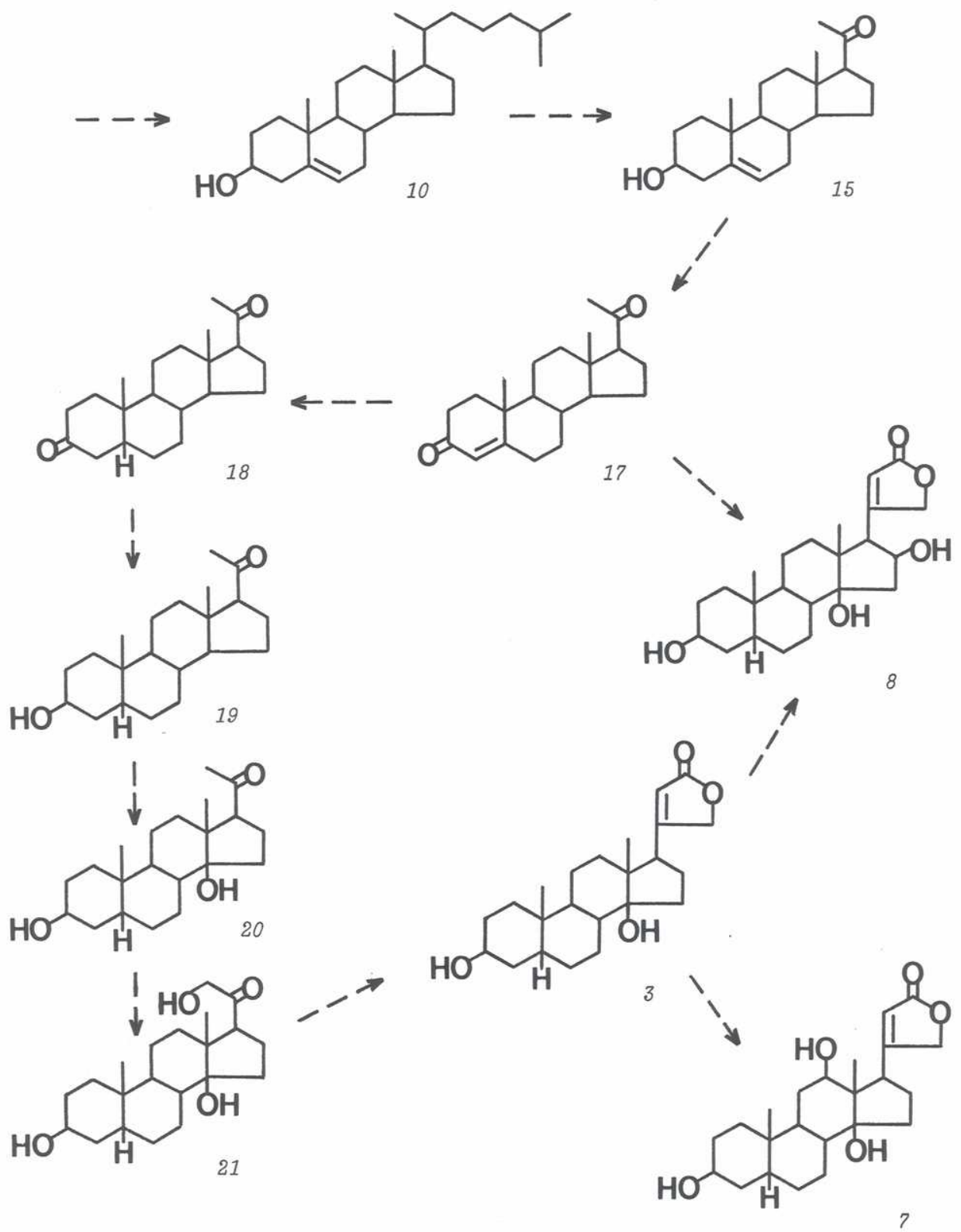
De acuerdo a los resultados descriptos anteriormente, la secuencia confirmada hasta el momento para el camino biosintético de los cardenólidos en plantas del género *Digitalis* es la presentada en el esquema 7.

Una vez descartada la participación de los hidrógenos de la posición 15⁴⁰, los intentos de determinar el camino de hidroxilación en posición 14 con orientación β se basaron en la participación de un doble enlace 8(14).

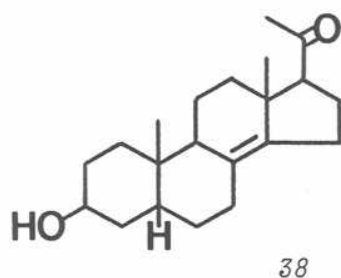
Tal como se planteó, los trabajos realizados sobre este tema introdujeron resultados contradictorios. Por un lado, Caspi y colaboradores⁴¹ dedujeron que la hidroxilación ocurre sin la pérdida del hidrógeno de carbono 8 de colesterol, con lo que se eliminaría la olefina planteada. Por otro lado, casi simultáneamente, Tschesche y Kleff⁴² aseguraron que 5 β -pregn-8(14)-en-3,20-diona (33) es precursor de digitoxina.

Es decir que, con los datos existentes hasta el momento, no sólo no era posible aclarar el mecanismo biosintético de la hidroxilación 14 β , sino que además no estaba asegurada la participación del doble enlace 8(14). Por ello el primer objetivo del presente trabajo fue elucidar la posible incorporación en el proceso biosintético de un intermediario con un doble enlace 8(14) y así poder aclarar la disyuntiva planteada.

Para ello se sintetizó [21-¹⁴C] 3 β -hidroxi-5 β -pregn-8(14)-en-20-ona (38). A diferencia del compuesto ensayado por Tschesche y Kleff (33) este producto presenta una estructura esteroidal que se encuentra más próxima a la de los cardenólidos ya que, tal como se puede observar en el esquema 7, sería el in-

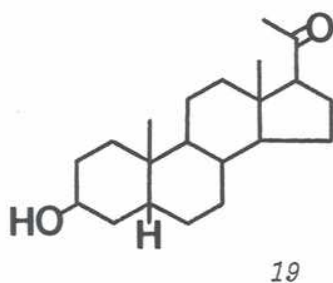


Esquema 7: Intermediarios conocidos de la biosíntesis de cardenólidos



intermediario incluido entre los compuestos 19 y 20.

Por otra parte se utilizó como compuesto testigo $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (19).

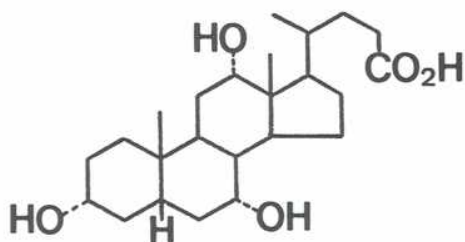


La inoculación de los dos sustratos (19 y 38) se efectuó en forma paralela, al igual que la extracción y procesamiento de los cardenólidos. De esta manera la correcta incorporación del intermediario biosintético 19 resultaría un aval para los resultados obtenidos con el supuesto precursor 38.

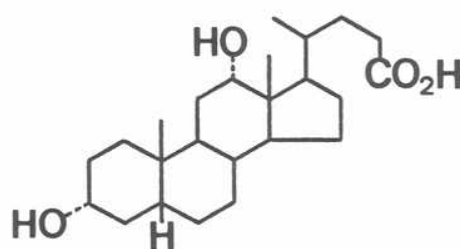
Tal como se planteó previamente el segundo objetivo del presente trabajo era la síntesis de $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregn-8(14)-en-20-ona (38) y de $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (19).

Si bien existían varias posibilidades para la elección del material de partida, se optó por desarrollar los caminos sintéticos usando ácidos biliares como precursores.

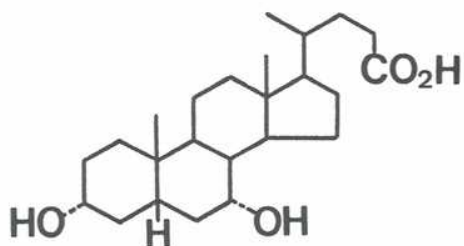
Estos compuestos presentan un sistema tetracíclico esteroidal con unión de anillos A/B *cis*. Los cinco carbonos de la cadena lateral corresponden en estructura y en configuración del carbono 20 a los cinco primeros átomos de carbono de la cadena lateral del colesterol. Todos los ácidos biliares naturales tienen un grupo hidroxilo en carbono 3 que está orientado hacia el lado α de la molécula. Tienen la misma orientación de la cadena lateral y de los metilos angulares que el colesterol y también la misma fusión de anillos B/C y C/D (*trans*). Dentro de los más comunes se encuentran los siguientes:



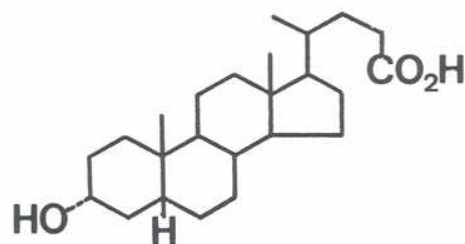
ácido cólico (39)



ácido desoxicólico (40)



ácido quenodesoxicólico (41)



ácido litocólico (42)

De acuerdo a lo descripto se deduce que los ácidos biliares presentan:

- La misma estereoquímica en carbono 5 (5β) que los compuestos a sintetizar.
- Una cadena lateral que podía ser degradada a la de un ácido etiánico por un camino que involucrara como intermediario a un 20-ceto pregnan derivado.
- El hidroxilo de carbono 3 cuya configuración podía ser invertida.
- En el caso del ácido quenodesoxicólico (41), un hidroxilo en carbono 7 cuya deshidratación podía originar el doble enlace $8(14)$ buscado.

Por un lado todos estos factores permitían preveer el desarrollo de interesantes caminos sintéticos. Por otro lado, y también como factor de decisión, eran compuestos fácilmente accesibles en cantidad y cuyo costo permitía en este caso el desarrollo de la labor planteada.

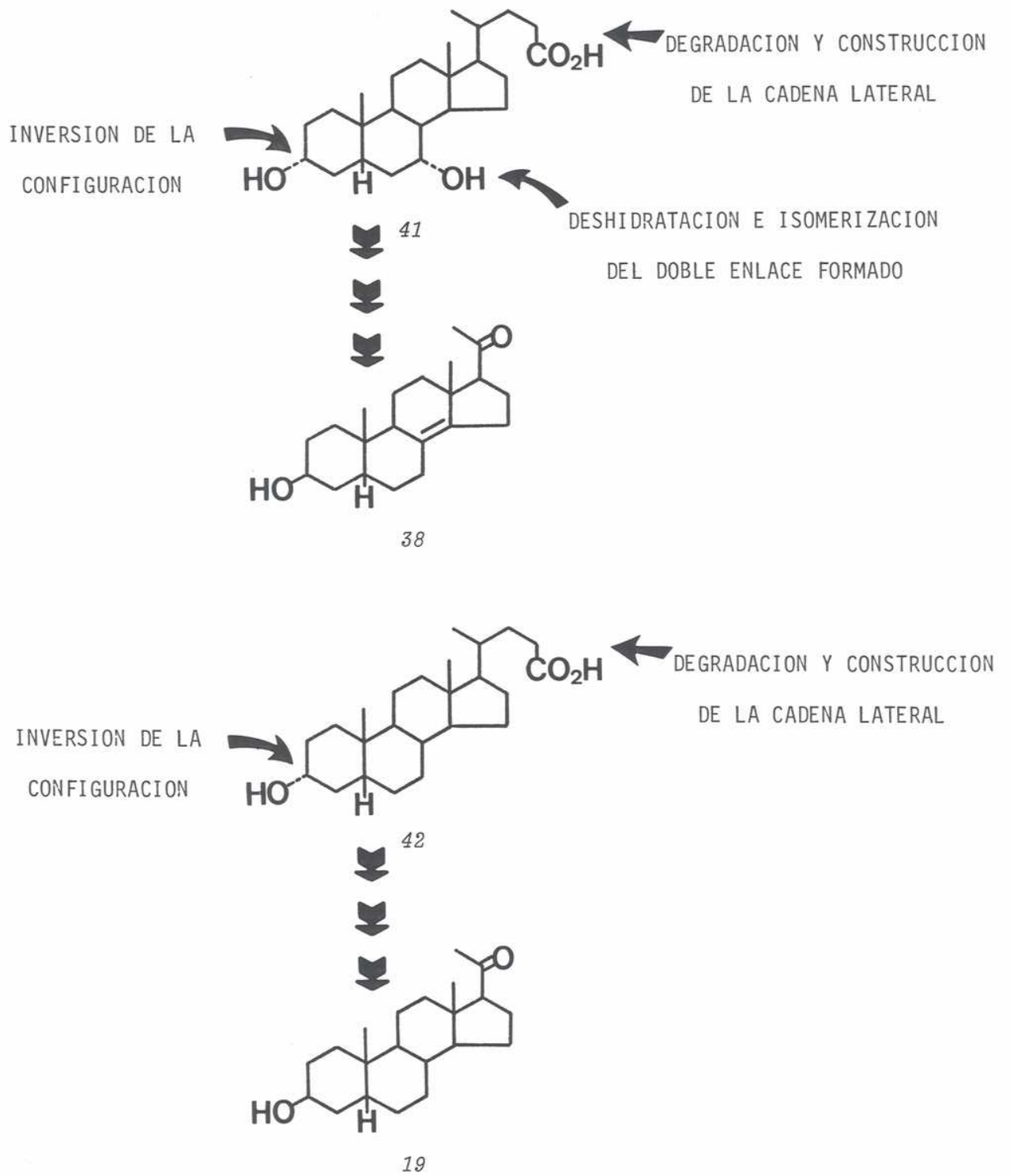
Teniendo en cuenta todo ello, se eligió el ácido quenodesoxicólico como producto de partida para el compuesto 38 y el ácido litocólico (42) como producto de partida para el 19.

Tal como se discutirá posteriormente, interesó desarrollar dichas síntesis

introduciendo la marcación isotópica en el carbono 21 en los pasos finales de las mismas. Esto implicó una degradación de la cadena lateral del ácido biliar hasta una del tipo ácido etiánico.

Interesaba también, por los motivos expuestos en la página 114, desarrollar los caminos sintéticos a través de un intermediario con cadena lateral del tipo 20-ceto pregnano (anterior en la degradación al ácido etiánico) que permitiera en un futuro trabajo la elongación de la misma.

Las modificaciones a introducir sobre los ácidos 41 y 42 se resumen en el esquema 8.



Esquema 8: Esteroides de partida para la síntesis de los compuestos 19 y 38.

Los compuestos de partida, intermediarios y finales utilizados y obtenidos en el presente trabajo (salvo pocas excepciones) tenían la característica común de ser derivados esteroidales con fusión de anillos A/B *cis*. Debido a que estos compuestos no son tan comunes en la naturaleza como sus isómeros A/B *trans*, no se encontraban en literatura demasiados datos de análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C . Es por ello que, como una contribución que en ese sentido se podía aportar, se asignaron los espectros obtenidos para cada uno de ellos. La necesidad en muchos casos de tener valores de asignación fidedignos correspondientes a espectros de compuestos patrones, requirió la síntesis de algunos derivados que no eran accesibles comercialmente.

La correlación de los datos obtenidos permitió el análisis de la influencia de diferentes configuraciones en el carbono 3; la influencia de distintas cadenas laterales sobre el sistema anular; las diferencias en distintos derivados por la introducción de un sustituyente en el carbono 7 y de un doble enlace en la posición 8(14). Dicho análisis permitió también la predicción del conformero favorecido para los ácidos biliares en solución.

**DESCRIPCION DE LA
LABOR REALIZADA**

SINTESIS DE

$|21-^{14}\text{C}|$ 3 β -HIDROXI-5 β -PREGN-8(14)-EN-20-ONA

Y DE $|21-^{14}\text{C}|$ 3 β -HIDROXI-5 β -PREGNAN-20-ONA

A PARTIR DE ACIDOS BILIARES.

A continuación se discuten los métodos sintéticos empleados para las siguientes secuencias:

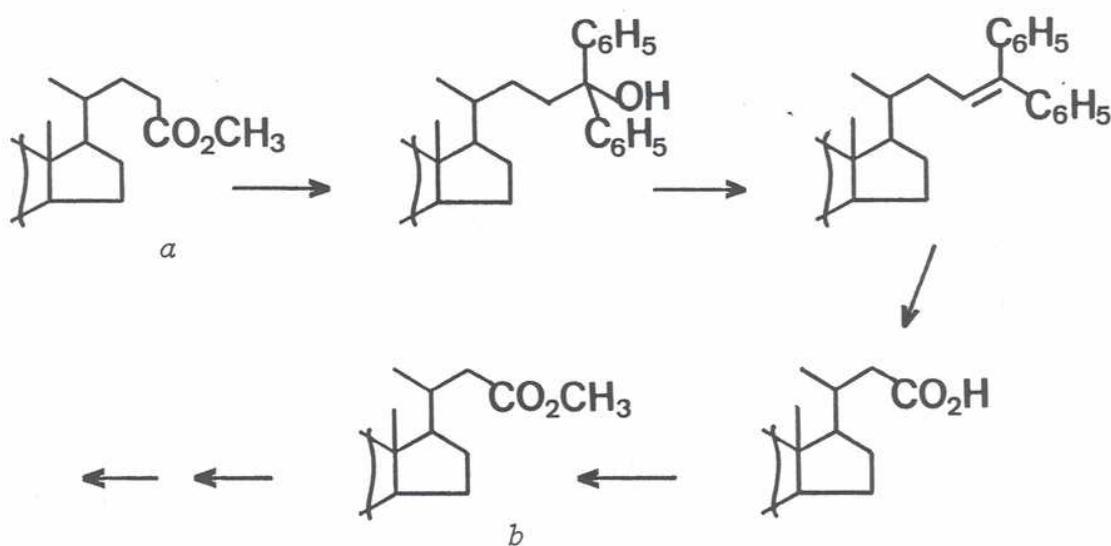
- A - Ensayos realizados para la degradación de la cadena lateral del ácido biliar a una cadena lateral del tipo ácido etiánico. Dichos ensayos se efectuaron utilizando como sustrato de partida el ácido quenodesoxicólico y se aplicaron sin mayores modificaciones al ácido litocólico.
- B - Ensayos realizados para la inversión de la configuración del carbono 3. Por las razones expuestas en la página 48 , se efectuaron sobre los ésteres metílicos de los ácidos litocólico o quenodesoxicólico según el caso.
- C - Ensayos realizados para la deshidratación del hidroxilo de carbono 7 e isomerización del doble enlace formado a la posición 8(14). Dichas pruebas se efectuaron sobre el ácido quenodesoxicólico.
- D - Ensayos realizados para la construcción de la cadena lateral del tipo 20-ceto pregnano a partir de la cadena del tipo ácido etiánico obtenida según A. Dicho procedimiento, que debía permitir el uso de pequeñas cantidades de esteroide y reactivo, sería el empleado para el armado de la cadena lateral de los dos productos (19 y 38) a utilizar en los estudios biosintéticos. Los ensayos se efectuaron sobre el ácido 3 β -hidroxiandroster-5-en-17 β -carboxílico (75) dado que era un producto comercialmente disponible.
- E - Síntesis total de $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregn-8(14)-en-20-ona (38).
- F - Síntesis total de $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (19).

A - DEGRADACION DE LA CADENA LATERAL

El objetivo de esta etapa era transformar la cadena lateral de un ácido biliar en la cadena de los ácidos etiánicos ($17\beta\text{-CO}_2\text{H}$) pasando por una cadena intermediaria del tipo 20-ceto pregnano.

A1 - DEGRADACION DEL ACIDO BILIAR AL 20-CETO PREGNANO

La primera degradación de la cadena lateral de un ácido biliar apareció en literatura en 1926⁴⁴ y se basa en sucesivas oxidaciones de los carbinos que se obtienen por reacciones de Grignard a partir de los ésteres de ácidos colánicos (a) y de sus homólogos inferiores (b) (esquema 9).

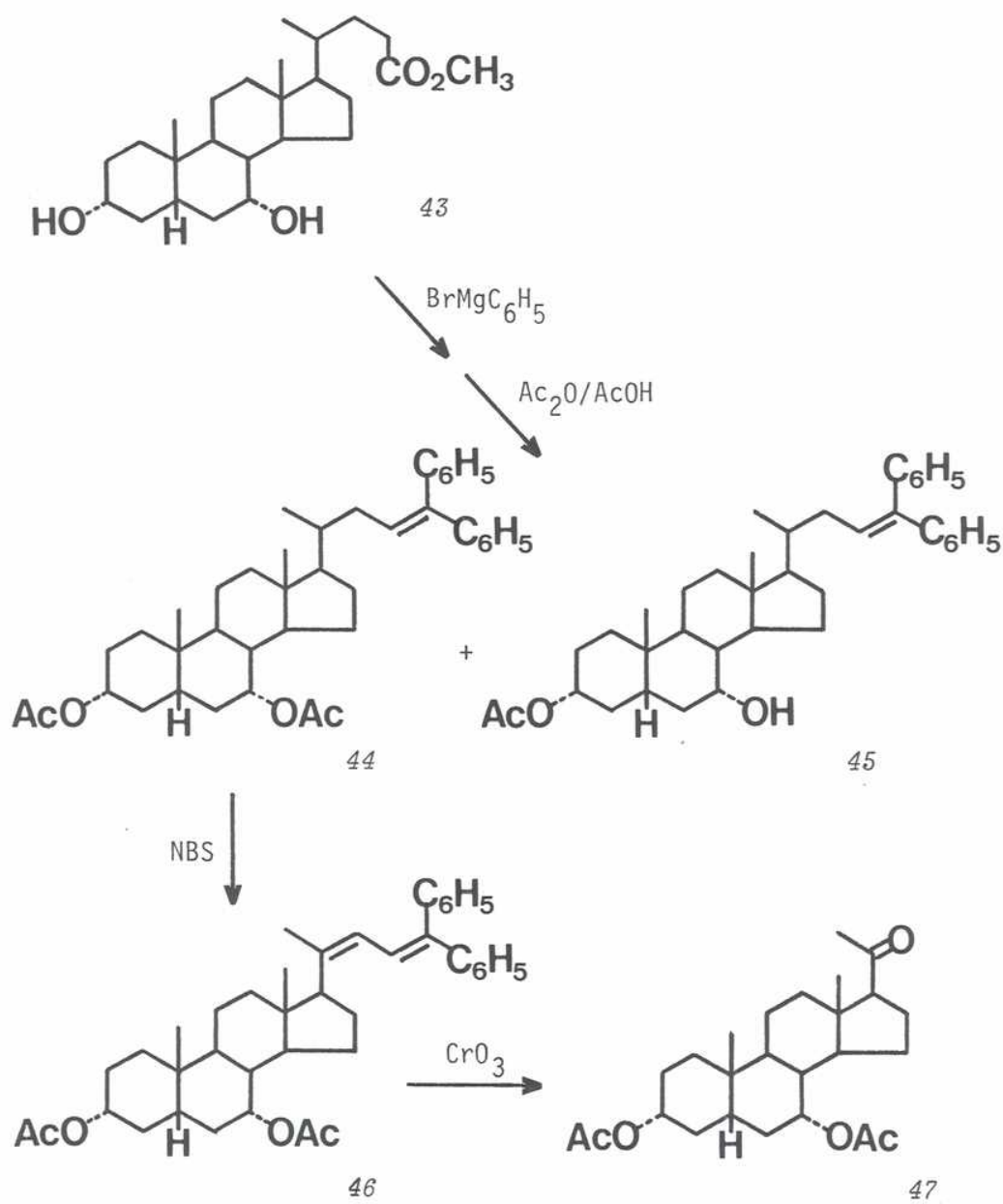


Esquema 9: Degradación de Wieland de los ésteres de ácidos colánicos.

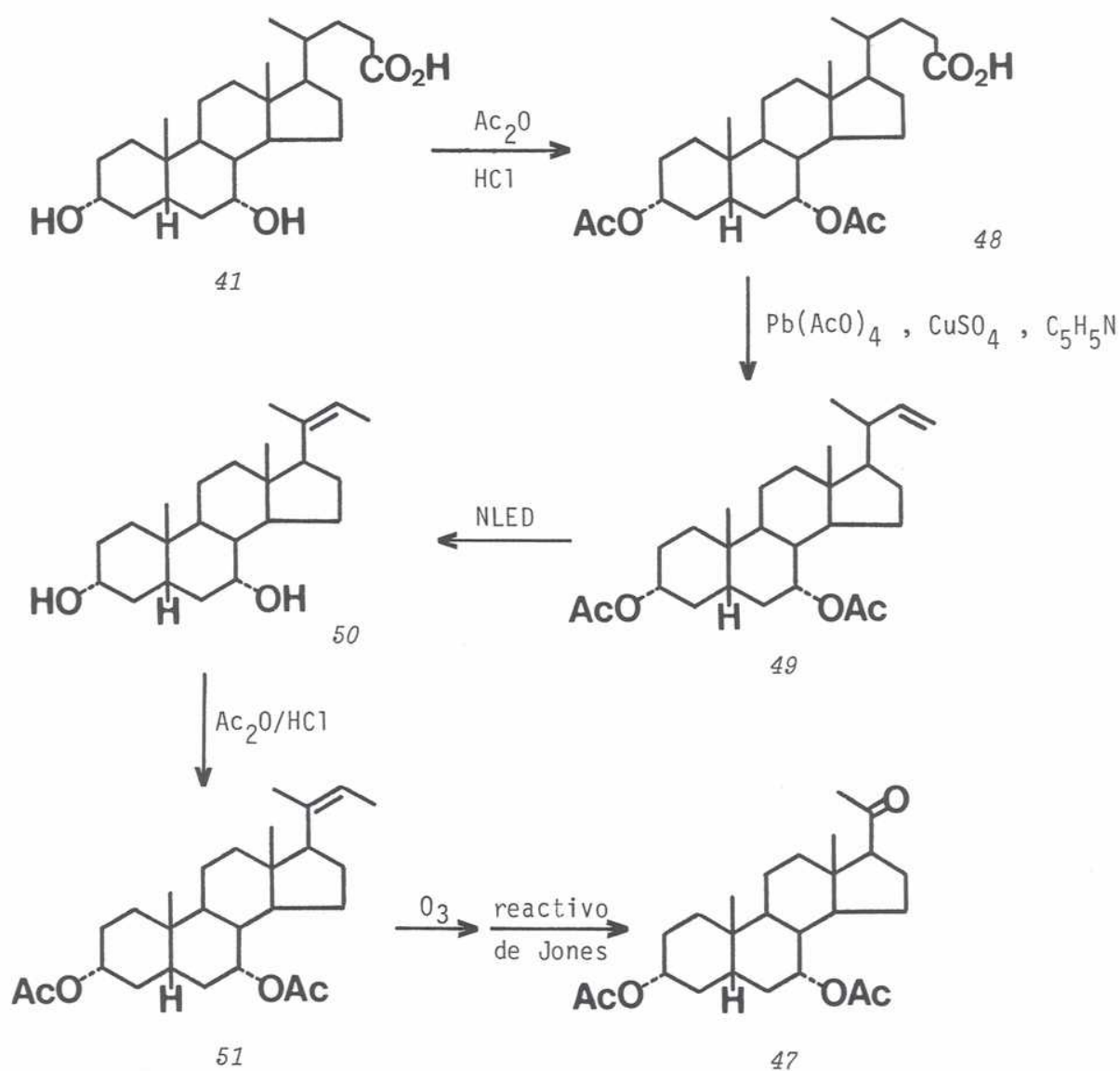
En 1970 Tschesche y colaboradores²⁴, usando algunos datos anteriores⁴⁵, modificaron favorablemente el esquema anterior y presentaron una nueva degradación

que fue aplicada, en ese caso, a un derivado del ácido desoxicólico (40).

Los estudios se iniciaron probando esta última variante sobre quenodesoxicolato de metilo (43) (esquema 10).



El rendimiento total obtenido sólo alcanzó 1,3 %. Si bien este valor podía elevarse mejorando las condiciones de reacción en algunos pasos, antes de hacerlo se decidió probar una tercera alternativa (esquema 11). Este ensayo se efectuó modificando los grupos protectores indicados en la técnica original⁴⁶ con el fin de simplificarla, adecuándola a las necesidades del presente trabajo.



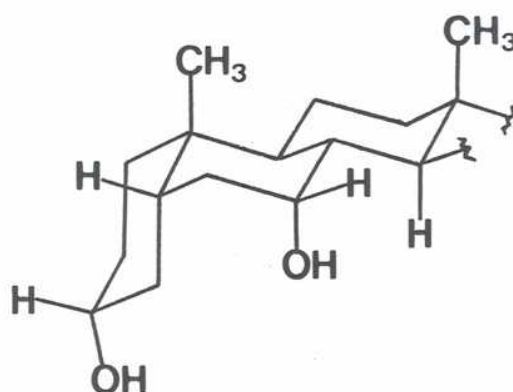
Esta última secuencia es la que finalmente se adoptó pues su rendimiento total resultó ser muy superior al de la anterior (aproximadamente 30%).

Se discuten a continuación las adaptaciones realizadas.

- Obtención del ácido $3\alpha,7\alpha$ -diacetoxi- 5β -colan-24-oico (48).

Se intentó efectuar la acetilación del ácido quenodesoxicólico con las técnicas tradicionales, usando anhídrido acético y piridina o mezclas de ácido acético y anhídrido acético. Sin embargo los resultados no fueron satisfactorios pues aún modificando en ambos casos la temperatura y/o las cantidades relativas de los reactivos no se lograba acetilar completamente el hidroxilo de carbono 7.

Esto puso en evidencia la marcada diferencia estructural que existe entre los dos hidroxilos del ácido quenodesoxicólico, ya que si bien los dos grupos tienen orientación α , debido a la relación *cis* entre los anillos A y B, el que está unido a carbono 3 es ecuatorial y expuesto mientras que el unido a carbono 7 es axial y queda semiprotegido.



Por ello, para lograr la acetilación completa se necesitó un medio más enérgico de reacción. Se eligió una mezcla de anhídrido acético y ácido clorhídrico a ebullición con la que se logró un elevado rendimiento en el producto buscado.

- Obtención del diacetato de 24-nor-5 β -col-22-eno-3 α ,7 α -diol (49).

La descarboxilación oxidativa de ácidos carboxílicos por acción del tetraacetato de plomo permite obtener una variedad de compuestos dependiendo de las condiciones experimentales y de la estructura del ácido⁴⁷. Las condiciones descritas por los autores indicaban el empleo de benceno como solvente en una reacción catalizada por: i) acetato de cobre, en cuya presencia los ácidos carboxílicos primarios se descarboxilan para formar alquenos como producto principal y ii) piridina que acelera el proceso de descarboxilación.

Como el rendimiento obtenido en las condiciones especificadas por los autores no superó el 42%, se variaron las mismas para mejorarlo tal como se detalla a continuación.

Dado que existían evidencias postulando para esta reacción un mecanismo en cadena por radicales libres, se repitió la experiencia en las mismas condiciones pero en la oscuridad, suponiendo que la luz podría afectar su desarrollo. Sin embargo esta modificación no varió los resultados obtenidos.

En la siguiente prueba se duplicó la cantidad de tetraacetato de plomo utilizado, agregándolo en porciones pequeñas y separadas por intervalos de aproxi-

madamente una hora. Este cambio se introdujo pensando que tal vez el tiempo de vida media de los radicales intervinientes era menor que el tiempo de reacción. Con ello se logró modificar favorablemente el resultado obtenido.

En las siguientes pruebas se analizaron la temperatura y el tiempo de reacción. Los métodos presentados en literatura recomiendan en general para estas reacciones usar la menor temperatura posible con el fin de evitar posteriores oxidaciones de los productos obtenidos, por acción del tetraacetato de plomo. Como en este caso dichas reacciones laterales no se presentaban, se descartó la posibilidad de usar solventes de menor temperatura de ebullición. Por el contrario, en intentos para acrecentar el rendimiento, se elevó la temperatura de 81°C a 110°C usando tolueno anhidro en lugar de benceno. Este cambio no introdujo variaciones en los resultados anteriores.

Por otro lado, se analizó la posibilidad de cambiar el tiempo de reacción prolongando el calentamiento después de haber finalizado el agregado del reactivo. Se comprobó de esta manera por ccd que la reacción avanzaba formando producto hasta un determinado momento a partir del cual se llegaba a un equilibrio.

Por último, se probó continuar con el calentamiento y el agregado de porciones de reactivo durante varias horas. Se observó entonces por ccd que se llegaba a una cierta etapa a partir de la cual frente a un importante agregado de tetraacetato de plomo sólo se producía una pequeña variación en la cantidad de alqueno.

La introducción en la técnica original de las modificaciones mencionadas permitieron elevar el rendimiento a 60%.

El producto de la reacción estaba formado por una mezcla de la olefina buscada (49) y el ácido de partida (48) que no había reaccionado. Estos se separaron por cromatografía en columna.

Los datos espectroscópicos del alqueno coincidieron con los de la literatura⁴⁶ aunque el punto de fusión del producto puro resultó superior.

- Obtención del 24-nor-5 β -col-20(22)-eno-3 α ,7 α -diol (50).

La N-litioetilendiamina funciona como un catalizador en reacciones de isomerización de olefinas. Beloeil y Fétizon⁴⁶ usaron este reactivo para isomerizar dobles enlaces de esteroides, de posición 22 a 20(22) y lo hicieron según un método descrito previamente por Narula^{48,49}.

Para la preparación del reactivo se probaron dos técnicas. En un primer ensayo se agregó una solución de butil litio en hexano (previamente valorada) sobre etilendiamina (secada primero con hidróxido de potasio y luego con filtros moleculares), en atmósfera de nitrógeno. Con el reactivo preparado de esta manera no se obtuvo el resultado deseado, ya que la reacción no ocurrió.

Dado que una de las causas del fracaso podía ser el secado deficiente de la etilendiamina, notablemente difícil de realizar, y teniendo en cuenta que la reacción de la etilendiamina con sodio es muy lenta, se efectuó su secado por tratamiento con sodio y calentamiento a reflujo⁵⁰.

Por otro lado se decidió usar litio metálico en lugar de butil litio para preparar el reactivo.

Con la N-litioetilendiamina sintetizada en las nuevas condiciones se logró la isomerización buscada con excelentes rendimientos.

- Obtención de diacetato de 24-nor-5 β -col-20(22)-eno-3 α ,7 α -diol (51) y de 3 α ,7 α -diacetoxi-5 β -pregnan-20-ona (47).

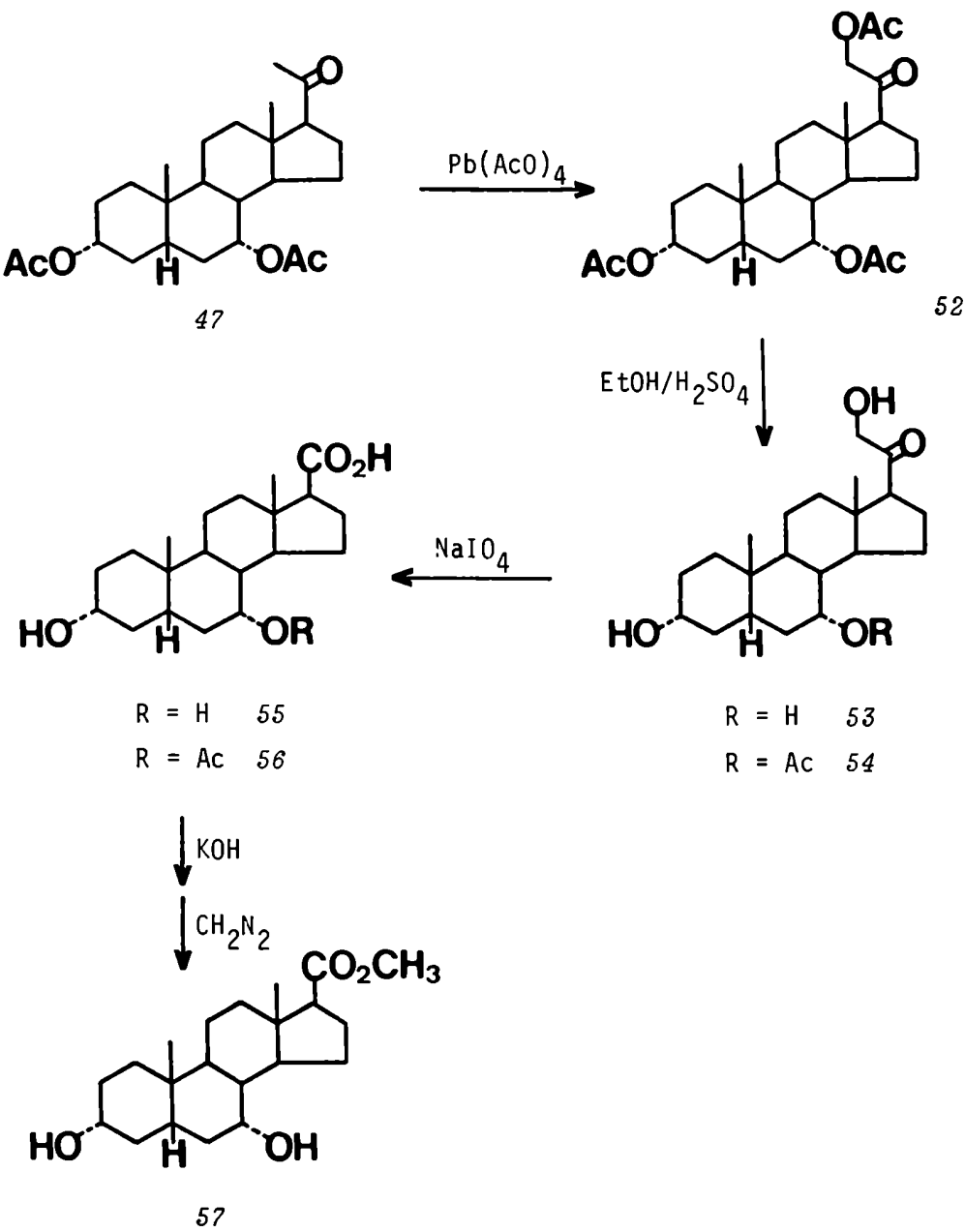
En las condiciones fuertemente básicas de la reacción anterior se produce la saponificación de los acetatos de los carbonos 3 y 7. Por lo tanto, una vez aislado el producto de la isomerización se volvieron a acetilar los hidroxilos usando la técnica descrita para la obtención del compuesto 48.

La ozonólisis del doble enlace de la posición 20(22) del esteroide rindió la cetona 47. Los resultados logrados efectuando el ensayo a -60°C fueron los mismos que se consiguieron a la temperatura de un baño de hielo y sal (-12°C).

Tampoco se observó diferencia entre las dos técnicas probadas para la ruptura del ozónido ya que tanto con agua oxigenada como con el reactivo de Jones los rendimientos fueron los mismos. Se eligió entonces el empleo del reactivo de Jones porque permitía una más rápida obtención del producto final.

A2 - DEGRADACION DEL 20-CETO PREGNANO AL ACIDO ETIANICO

La secuencia sintética desarrollada se indica en el esquema 12.



La funcionalización en carbono 21 de la cetona 47 se llevó a cabo con tetraacetato de plomo en una reacción catalizada con trifluoruro de boro en éter y metanol⁵¹ para dar el compuesto 52.

La ruptura del enlace entre los carbonos 20 y 21 se efectuó por tratamiento con periodato de sodio⁵², previa liberación del hidroxilo de carbono 21. Para ello se realizó una hidrólisis ácida, comprobándose luego del tratamiento la presencia de dos productos de reacción (53 y 54) que se separaron por cromatografía en columna. El análisis por espectroscopía de RMN-¹H demostró que los productos eran 3 α ,7 α ,21-trihidroxi-5 β -pregnan-20-ona (53) y 7 α -acetoxi-3 α ,21-dihidroxi-5 β -pregnan-20-ona (54) en una relación de 1:16 respectivamente.

Dado que los compuestos de la mezcla tenían libre el hidroxilo de carbono 21 y que el grupo acetato de carbono 7 presente en uno de ellos no interfería en la reacción de corte de la cadena lateral con periodato, se procedió a efectuar la misma sobre la mezcla tal cual.

Se obtuvieron de esta manera los ácidos etiánicos 55 y 56. La saponificación de esta nueva mezcla y una posterior reacción de metilación dió como único producto el éster 57.

B - INVERSION DE LA CONFIGURACION DEL CARBONO 3

Las síntesis de los compuestos 19 y 38 a partir de los ácidos litocólico y quenodesoxicólico requería la inversión de la configuración del carbono 3 del esteroide de partida. Existen varios métodos para realizar dicha inversión. Entre ellos se consideraron:

B1 - Inversión por oxidación y reducción

B2 - Inversión directa con azodicarboxilato de etilo

B3 - Inversión por una reacción de sustitución

Se analizarán a continuación los resultados obtenidos con cada uno de estos métodos.

B1 - INVERSION POR OXIDACION Y REDUCCION

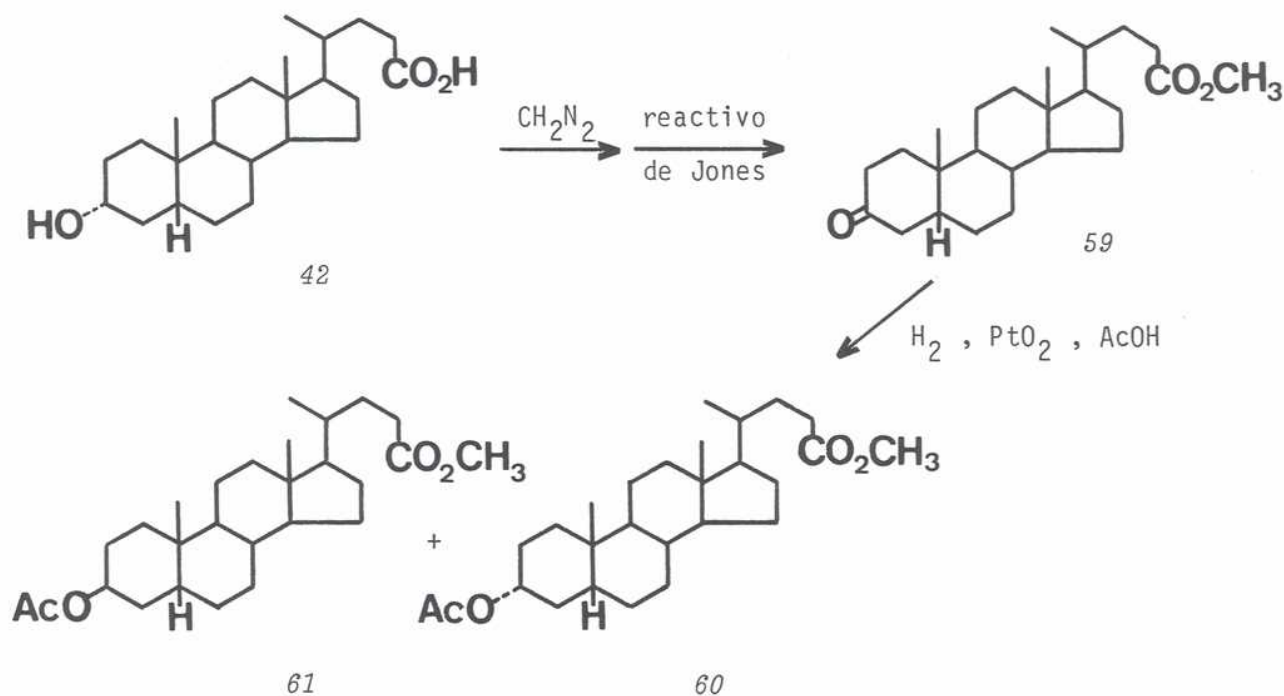
Involucra la reducción de 3-ceto derivados para obtener los alcoholes axiales correspondientes, usando un catalizador apropiado.

Esta técnica ha sido empleada con éxito en varios esteroides^{53,54} pero presenta como inconveniente que el rendimiento en el epímero 3β a partir del 3-ceto derivado depende del número y la posición de los otros grupos hidroxilo presentes en la molécula. Por ejemplo, la proporción de los epímeros axiales formados, en general, disminuye cuando aumenta el número de hidroxilos⁵⁴.

El ácido quenodesoxicólico tiene dos hidroxilos, en los carbonos 3 y 7, pero en los proyectos preliminares de la síntesis se consideró que si se adoptaba este método se podría realizar la deshidratación del hidroxilo de carbono 7 antes de

inversión de la configuración del carbono 3. Teniendo en cuenta este detalle se decidió usar ácido litocólico como compuesto modelo ya que permitía tener condiciones similares a las que se presentarían en la síntesis final.

Los pasos seguidos fueron los representados en el esquema 13.



Esquema 13: Inversión por oxidación y reducción.

El ácido litocólico (42) se trató con diazometano para obtener el éster metílico correspondiente (58) que posteriormente se oxidó con el reactivo de Jones. La cetona resultante (59) se redujo por hidrogenación catalítica, pues es conocido⁵⁵ que la reducción de 3-ceto derivados de 5β -esteroides con hidruros, conduce al alcohol con orientación α .

El análisis del producto de la hidrogenación por ccd indicó la presencia de una única mancha de Rf mayor que el de la cetona de partida. El espectro IR del mismo no presentó las señales correspondientes a hidroxilos libres y finalmente el espectro de RMN-¹H permitió determinar que dicho producto era una mezcla de los derivados 3 α y 3 β acetilados (60 y 61) del esteroide inicial (58). Pese a que los autores obtenían los alcoholes, en este caso la técnica condujo a la mezcla de acetatos, que se formaron por reacción del alcohol con el solvente de la reacción de hidrogenación (ácido acético y gotas de ácido clorhídrico).

El estudio de la relación de los metilos angulares en el espectro de RMN-¹H permitió llegar a la conclusión de que la reducción de la cetona dió una mezcla prácticamente equimolecular de los dos epímeros, los cuales no pudieron ser separados por cromatografía incluso empleando distintos sistemas de solventes.

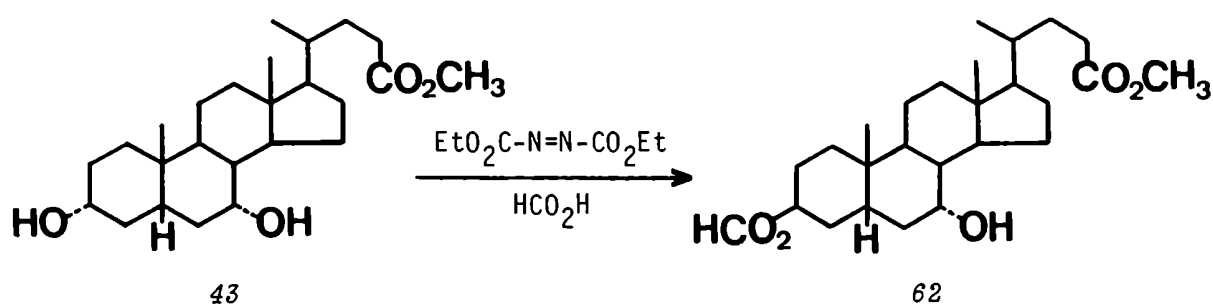
De todas maneras el resultado obtenido descartaba la posibilidad de uso del método debido a que disminuía notoriamente el rendimiento de la secuencia sintética.

B2 - INVERSION DIRECTA CON AZODICARBOXILATO DE ETILO

Esta segunda técnica probada permitía la inversión de configuración en un solo paso de síntesis. Según Bose y colaboradores⁵⁶ el uso de azodicarboxilato de etilo en presencia de ácido fórmico conducía, en algunas horas y con buen rendimiento, a la formación de un formil derivado estéricamente puro cuya saponifi-

cación rendía el epímero del alcohol inicial.

Estos autores encontraron, sobre la base de pruebas hechas con varios sustratos, que los factores estéricos juegan un rol importante en el éxito de la reacción. Cuando los ésteres metílicos de los ácidos cólico (39) y desoxicólico (40) se trataron en las condiciones discutidas, la formilación ocurrió sólo en carbono 3 con inversión de configuración, mientras que los grupos hidroxilo de carbono 7 y 12 no se modificaron. Teniendo en cuenta este resultado, se decidió hacer la prueba sobre quenodesoxicolato de metilo, ya que el hidroxilo de carbono 7 no interferiría en la reacción (esquema 14).



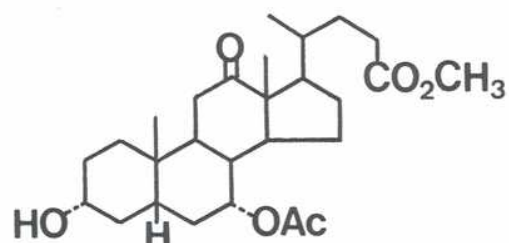
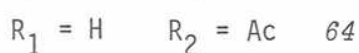
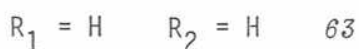
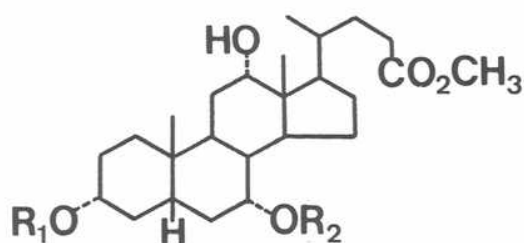
Esquema 14: Inversión directa con azodicarboxilato de etilo.

El método consiste en el tratamiento a temperatura ambiente de una mezcla del alcohol esteroidal, trifenilfosfina y azodicarboxilato de etilo en tetrahidrofurano, con un ácido como fórmico (el usado en este caso) o benzoico.

Luego de repetir varias veces la reacción se pudo comprobar que el rendimiento final en el producto esperado no superaba el 20%. Esto se debía a dos

factores. Por un lado, pese a modificaciones introducidas, quedaba gran parte del producto de partida sin reaccionar. Por otra parte, debido a la gran cantidad de óxido de trifenilfosfina formado durante la reacción, la separación cromatográfica resultaba muy engorrosa, dando como resultado pérdidas del producto buscado que contribuían a disminuir el bajo rendimiento alcanzado.

En 1979 Chang⁵⁷ señaló que sus intentos de hacer uso de esta reacción fueron desafortunados. Por ejemplo, llevándola a cabo con colato de metilo (63) y ácido fórmico, pudo obtener el 3 β -formil derivado luego de una tediosa separación cromatográfica con sólo 15% de rendimiento. La aplicación del método sobre el 7 α -acetoxi-3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (64) con ácido fórmico y sobre el 7 α -acetoxi-3 α -hidroxi-12-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (65) con ácido fórmico o ácido benzoico no dieron el alcohol invertido deseado.



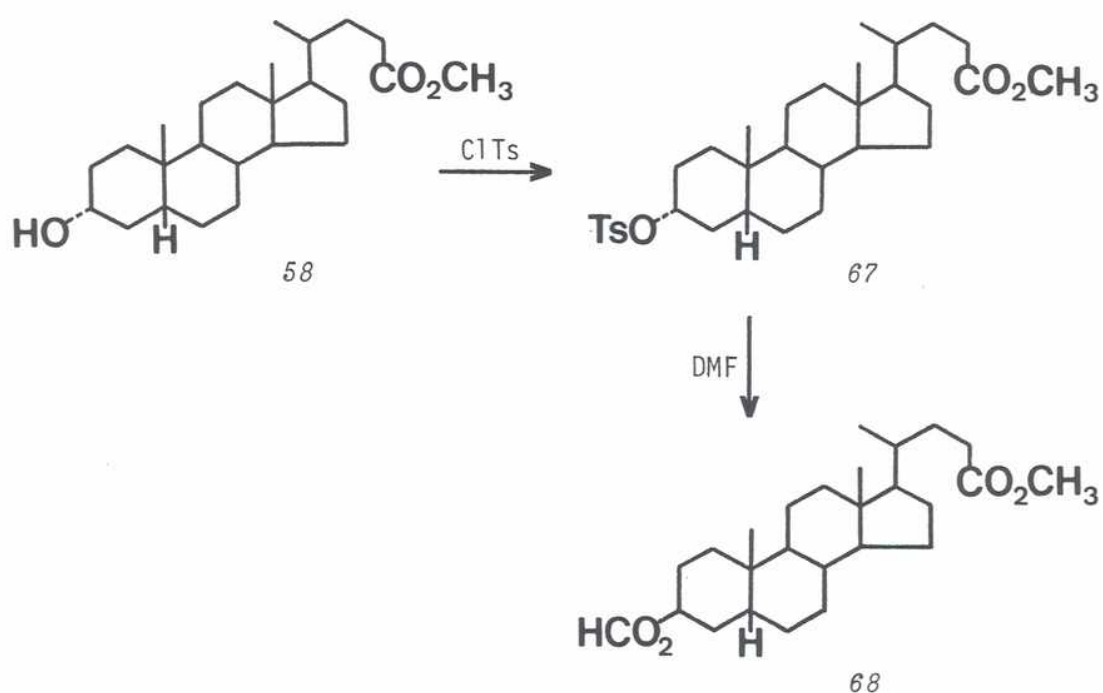
65

Teniendo en cuenta estos resultados, se pensó en probar los métodos clásicos que efectúan la inversión por desplazamiento de un grupo tosilato⁵⁸.

B3 - INVERSION POR UNA REACCION DE SUSTITUCION

Con el fin de evaluar los diversos procedimientos conocidos de este tipo, Chang los comparó, efectuando las reacciones correspondientes sobre el 3 α -tosi-
loxi-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (66). Así concluyó que, de los
métodos analizados, el más satisfactorio era el que usaba dimetilformamida, por
la simplicidad ya sea de los reactivos como de las condiciones de reacción, ade-
más de la facilidad de aislamiento del producto de la reacción y del buen ren-
dimiento. El único inconveniente era la velocidad de reacción.

Esta ha sido la tercera técnica probada. Se empleó como sustrato el litoco-
lato de metilo y los pasos desarrollados figuran en el siguiente esquema.



Esquema 15: Inversión por una reacción de sustitución.

Los factores que contribuyen al éxito del proceso de inversión son:

- control apropiado de la temperatura,
- pureza del tosil derivado del esteroide de partida,
- pureza de la N,N-dimetilformamida.

En varias publicaciones^{57,58,59} consideran la temperatura óptima para la reacción entre 77 y 81°C. Temperaturas mayores favorecen la formación de olefinas.

En lo que respecta al grado de pureza del reactivo, se indicó que la N,N-dimetilformamida Fisher con un contenido de agua de 0,08% era efectiva sin necesidad de un secado previo sobre filtros moleculares. En el presente caso se destiló la N,N-dimetilformamida con benceno previamente secado sobre sodio, recogiendo la fracción correspondiente al punto de ebullición de la misma. Esta fracción se secó sobre tamices moleculares.

Como algunos autores aseguran que el porcentaje de agua influye en el tiempo de reacción, se hicieron dos pruebas simultáneas: una con N,N-dimetilformamida purificada como se indicó en el párrafo precedente y otra con esa misma N,N-dimetilformamida a la que se agregó 1% de agua. Los resultados de estas dos pruebas no indicaron diferencia luego del tiempo recomendado en literatura (80 hs).

Con el objeto de determinar si ese tiempo de reacción recomendado era el adecuado se decidió efectuar algunos ensayos cuyos resultados se resumen a continuación:

72 hs de reacción: desaparición del tosil derivado de partida

→ reacción completa

61 hs de reacción: desaparición del tosil derivado de partida

→ reacción completa

48 hs de reacción: desaparición del tosil derivado de partida

→ reacción completa

38 hs de reacción: presencia del tosil derivado de partida

→ reacción incompleta

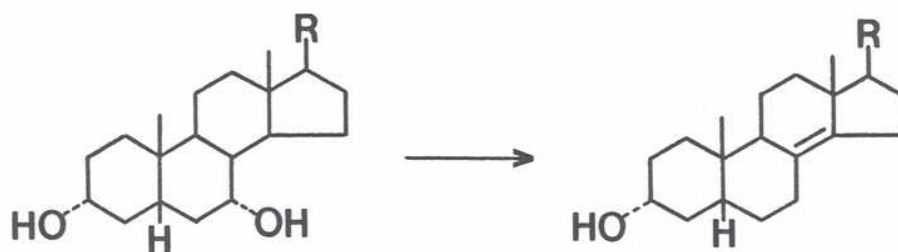
En todos los casos se observó por ccd la presencia de dos manchas, una con el mismo Rf que el reactivo de partida y otra con un Rf mayor. Estos productos se separaron por cromatografía en columna de silicagel y se analizaron por IR y RMN-¹H. Se concluyó que la mancha superior era el producto de eliminación y la mancha inferior el tosil derivado de partida o el formil derivado producto o una mezcla de ambos ya que no se separaban. En este último caso, en el espectro de RMN-¹H se pudo ver rápida y fácilmente la presencia de los grupos aromáticos, la señal correspondiente al hidrógeno del grupo formilo y las distintas señales correspondientes a los metilos angulares de ambos compuestos.

Además, tomando como patrón el espectro UV del cloruro de p-toluensulfonilo y el del tosil derivado de partida, también se pudo monitorear por esta técnica el avance de la reacción.

Finalmente se determinó que una vez desaparecido el tosilato de partida, el formil derivado y la olefina formados como productos de la reacción se encontraban en una relación aproximada de 2:1.

Considerando los resultados obtenidos y los datos recopilados, el último de los métodos se consideró el más conveniente.

C - DESHIDRATACION DEL HIDROXILO DE CARBONO 7 E ISOMERIZACION DEL DOBLE
ENLACE FORMADO A LA POSICION 8(14)



Las pruebas se hicieron sobre ácido quenodesoxicólico (41) ya que, salvo la cadena lateral, presentaba las mismas condiciones estructurales que podría presentar el futuro intermediario de la síntesis total.

Las condiciones de deshidratación de 5 β -esteroides hidroxilados en carbono 7 es un tema engorroso cuyo estudio se inició con las primeras reacciones de Bödecker en 1920⁶⁰. A partir de esa época y por varios años los investigadores dedicados al tema dispusieron de técnicas poco adecuadas e insuficientes para asegurar una correcta identificación de los distintos productos obtenidos. Durante mucho tiempo los datos de puntos de fusión, de poderes rotatorios o de microanálisis no permitieron aclarar las dudas sobre la localización de los dobles enlaces presentes en la molécula. Sumado a este hecho, el uso de sustratos con dos o más hidroxilos libres introducía una complicación adicional para la caracterización de los compuestos finales.

Se presenta a continuación un breve resumen de la información bibliográfica analizada antes de comenzar los ensayos de deshidratación e isomerización, con el fin de mostrar la disparidad de criterios existente en el momento de comenzar las pruebas.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS PARA AMBOS PASOS SINTETICOS

En 1935 Yamasaki⁶¹ estudió la deshidratación del ácido cólico (39) por tratamiento con ácido clorhídrico. Concluyó que el producto obtenido en la deshidratación presentaba un doble enlace en la posición 7 y que éste se interconvertía en los isómeros con el doble enlace en las posiciones 8(9) y 8(14) por acción del ácido clorhídrico en ácido acético a temperatura ambiente. Sus conclusiones se basaron en una comparación de puntos de fusión con los de compuestos patrones, luego de una aparentemente efectiva separación de los isómeros por maceración del producto crudo con alcohol. No deja de llamar la atención la nitidez en los puntos de fusión que abarcaban intervalos pequeños (en general 1°C) y se asemejaban a los valores verdaderos.

Posteriormente se describió en literatura un estudio sobre la deshidratación del ácido quenodesoxicólico llevado a cabo por el mismo autor⁶². Indicó que se formaban en la reacción dos productos, uno de los cuales identificó como el isómero con el doble enlace en posición 7. Para confirmarlo hidrogenó este alqueno de punto de fusión 185°C y obtuvo un producto de punto de fusión 193°C que consideró que era ácido litocólico (p.f. lit⁶² 185°C).

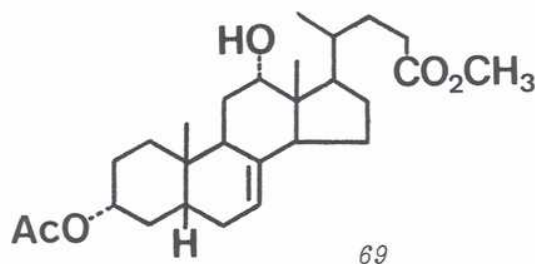
Ante este hecho cabe preguntar por qué el autor caracterizó el producto hidrogenado como ácido litocólico si existía entre éste y el ácido litocólico la misma diferencia de punto de fusión que entre dicho compuesto y el esteroide de partida. Además, el autor no indicaba la cantidad de hidrógeno absorbido.

Respecto del otro producto de la reacción, al que llamó ácido apoquenodesoxicólico, informó no haber determinado con exactitud la posición del doble enlace.

En 1946 Devor y colaboradores⁶³, utilizando ácido cólico como material de partida, efectuaron la deshidratación con cloruro de zinc como agente deshidratante y analizaron el solvente y la temperatura de reacción. Como resultado del análisis cambiaron el solvente de la técnica original que era ácido acético por acetona y consideraron el método sencillo y efectivo. Según informaron, tanto con ácido acético como con acetona obtenían los mismos productos, aunque en realidad desconocían cuáles eran. La única confirmación que hicieron fue que el producto obtenido sólo tenía un doble enlace, conclusión a la que llegaron basándose en el valor del equivalente de neutralización.

Simultáneamente con los trabajos de deshidratación descriptos surgieron una serie de investigaciones tendientes a isomerizar los dobles enlaces a otras posiciones con la idea de aclarar las estructuras de los compuestos obtenidos. Reichstein y colaboradores⁶⁴ hidrogenaron 3 α -acetoxi-12 α -hidroxi-5 β -col-7-en-24-oato de metilo (69) usando platino como catalizador y señalaron que el tratamiento isomerizaba el esteroide de partida pasando del isómero con el doble en-

lace en posición 7 al que lo tiene en posición 8(14). Para confirmarlo compararon los valores de punto de fusión y de poder rotatorio, observando para los mismos datos diferentes.



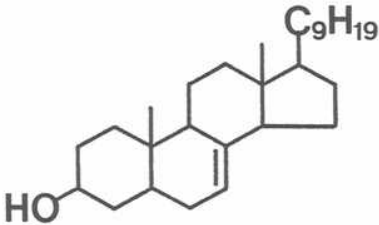
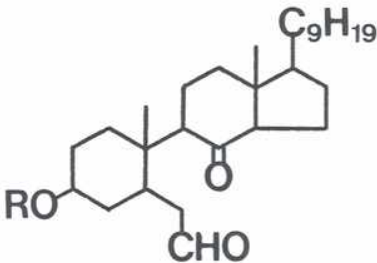
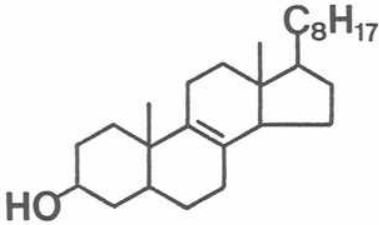
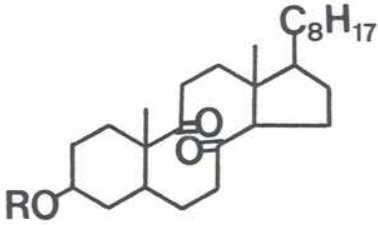
También apreciaron que no disminuía el punto de fusión mezcla del isómero $\Delta^{8(14)}$ (al que llamaron ácido apocólico) con un estándar de dicho compuesto.

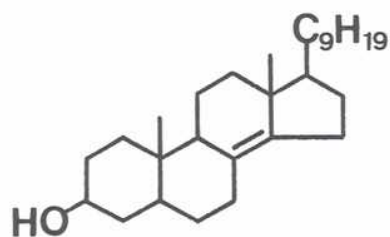
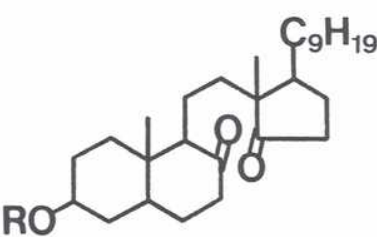
Este resultado se contrapone con lo encontrado por Yamasaki⁶². Tal como se indicó anteriormente, éste obtuvo ácido litocólico por deshidratación del hidroxilo de carbono 7 del ácido quenodesoxicólico e hidrogenación del Δ^7 derivado obtenido. Por lo tanto, las mismas condiciones de hidrogenación condujeron en un caso a una isomerización del doble enlace formado y en otro a su hidrogenación.

Posteriormente Barton⁶⁵ determinó que los valores de poder óptico rotatorio en el campo de los ácidos biliares insaturados permitían aclarar datos conflictivos y aclarar la estructura de varias sustancias. Como parte de sus conclusiones señaló que en la serie de los alocolanos (5α) la única doble ligadura de la molécula que resistía la hidrogenación catalítica, en ácido acético y a temperatura ambiente, era la correspondiente al isómero $\Delta^{8(14)}$. En cambio en la serie de los colanos (5β) era diferente; los Δ^7 derivados se reordenaban en pequeña proporción a $\Delta^{8(14)}$ con este procedimiento. Según Barton, los ácidos que figuraban en

la literatura como γ (Δ^7) y δ ($\Delta^{8(9)}$) colénicos, son mezclas de los isómeros Δ^7 y $\Delta^{8(14)}$.

Los conocimientos del tema se ampliaron en 1956 cuando Castells y Meakins⁶⁶ desarrollaron una técnica de oxidación de los dobles enlaces y estudio de los productos obtenidos por espectroscopía IR. Con este método se obtenían compuestos con características espectroscópicas fácilmente reconocibles. Para lograrlo trataban el esteroide (con los hidroxilos protegidos por bencilación) con tetróxido de osmio; el compuesto resultante se convertía en el correspondiente diol por reacción con hidruro de litio y aluminio y finalmente se lo oxidaba al compuesto carbonílico con tetraacetato de plomo. Así, por ejemplo, pudieron diferenciar los siguientes esteroides teniendo en cuenta las distintas señales que presentaban en el espectro IR los derivados obtenidos.

ESTEROIDE INICIAL	PRODUCTO FINAL	BANDAS IR DEL PRODUCTO
		2700 (d) 1725 (f) 1705 (f)
		1705 (f)

ESTEROIDE INICIAL	PRODUCTO FINAL	BANDAS IR DEL PRODUCTO
		1712 (f) 1735 (f)

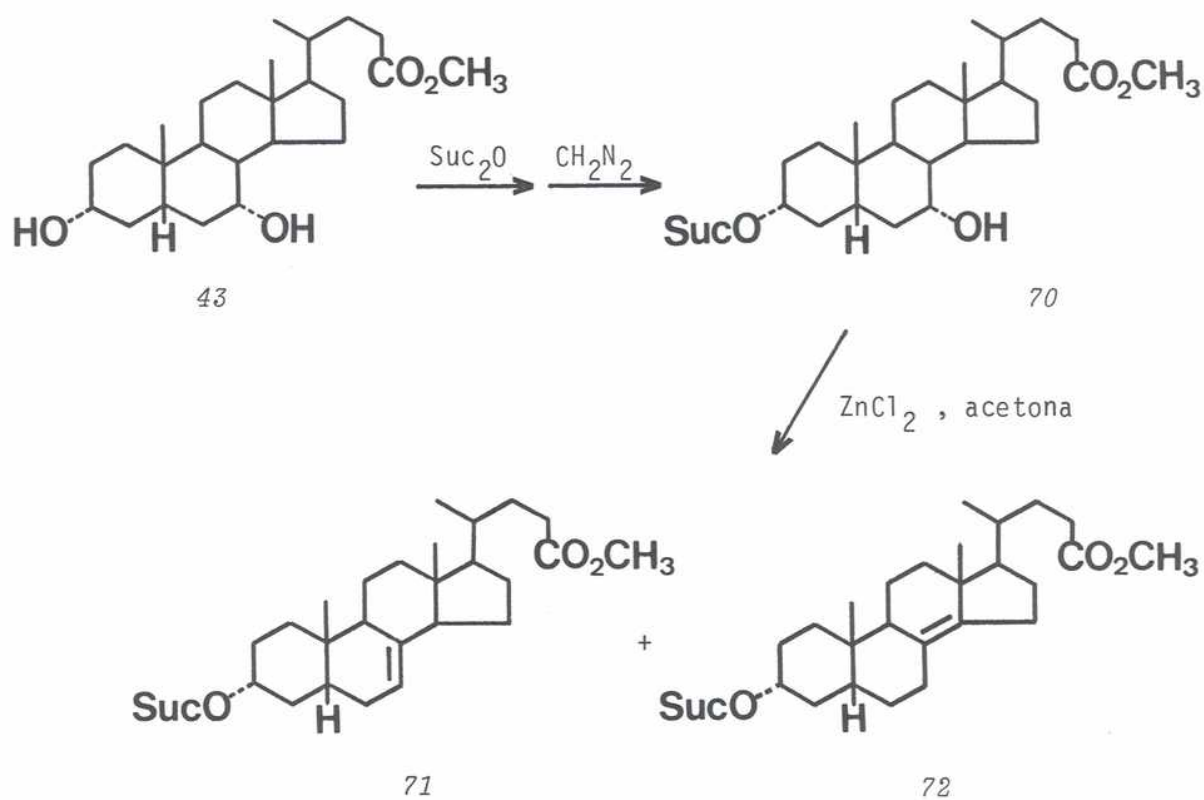
Planteado esquemáticamente el confuso panorama existente en la literatura, se describen a continuación los ensayos llevados a cabo para lograr ambos pasos sintéticos.

C1 - DESHIDRATACION DEL HIDROXILO DE CARBONO 7

Luego de la consideración de los datos expuestos, se iniciaron las pruebas de deshidratación del ácido quenodesoxicólico utilizando como agente deshidratante cloruro de zinc en acetona.

Cuando se analizaron los productos de la reacción por ccd se observaron varias manchas de intensidad similar, entre las que se encontraba la del reactivo de partida. Ante la complejidad de la mezcla de productos obtenida y previendo que el hidroxilo de carbono 3 podría interferir en la reacción, se decidió protegerlo con el fin de evitar su posible deshidratación (esquema 16).

Tal como se planteó anteriormente, el hidroxilo axial de carbono 7 se encuentra estéricamente impedido para la entrada de sustituyentes voluminosos, mientras que el grupo hidroxilo ecuatorial de carbono 3 se encuentra más expuesto. Esta diferencia estructural permite la protección selectiva de este último.



Esquema 16: Deshidratación del hidroxilo de carbono 7

La protección buscada se realizó por esterificación con anhídrido succínico⁶⁷. De esta forma se logró una apreciable mejora en el rendimiento de la reacción de deshidratación.

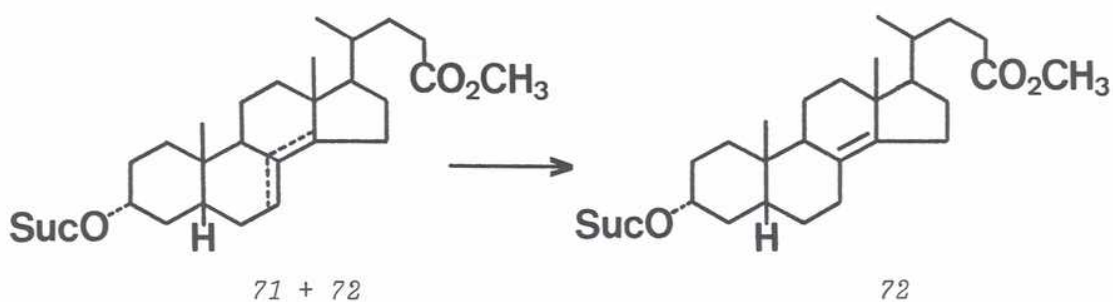
Finalmente se modificó la técnica original de deshidratación para lograr la conversión completa del alcohol de partida. Para ello se incluyó una secuencia de destilaciones, efectuadas luego del agregado de sucesivas porciones de acetona, tal como se indica en la parte experimental (pág. 172).

El análisis del producto final por IR demostró la ausencia de hidroxilos

libres. El espectro de RMN- ^1H del mismo, presentó las señales correspondientes a dos pares de metilos angulares cuyos valores de desplazamiento químico coincidían con los indicados en tablas⁶⁸ para los isómeros Δ^7 y $\Delta^{8(14)}$. Se observaba también la señal del hidrógeno olefínico de carbono 7. Estos datos corroboraban la presencia de una mezcla de los dos alquenos mencionados como producto de la reacción.

Además de la técnica de deshidratación con cloruro de zinc, se probó la que emplea como reactivo ácido clorhídrico en ácido acético⁶². Esta variante se descartó debido a su bajo rendimiento.

C2 - ISOMERIZACION DEL DOBLE ENLACE FORMADO DE POSICION 7 A 8(14)



Se llevaron a cabo varios ensayos a fin de encontrar las condiciones óptimas para la isomerización del doble enlace de posición 7 a posición 8(14) dado que, tal como se describió anteriormente, los resultados obtenidos por otros autores eran totalmente contradictorios.

Se efectuó la hidrogenación de la mezcla de 71 y 72 en diversas condiciones surgidas de combinar los dos tipos de catalizadores recomendados en diferentes solventes (ácido acético, acetato de etilo, mezclas de éstos, metanol) y con diferentes tiempos de reacción. Sin embargo el tratamiento fue ineficaz en todos los casos ya que al finalizar la hidrogenación se obtenía la mezcla de isómeros inicial.

Frente a estos resultados se decidió buscar una técnica alternativa. Wilson y colaboradores⁶⁹ encontraron que por tratamiento con dióxido de azufre líquido ocurre la migración de dobles enlaces en esteroides insaturados. En sus experimentos, el derivado acetilado del esteroide y el dióxido de azufre líquido se introducían en tubos que luego se sellaban, sin necesidad de una rigurosa exclusión de la humedad. Estos se dejaban durante varias horas a una temperatura adecuada.

Bajo las condiciones descriptas pudieron comprobar que los dobles enlaces aislados de cadena lateral y el doble enlace anular entre los carbonos 5 y 6 eran estables, en cambio los que estaban entre los carbonos 7 y 8 migraban a la posición 8(14).

Se probó esta técnica lográndose resultados satisfactorios. Sin embargo fue necesario optimizar el tiempo de reacción que para el derivado del ácido quenosoxicólico resultó ser de 24 horas.

El espectro de RMN-¹H del producto indicó una completa desaparición del isómero Δ^7 (desaparición de las señales del hidrógeno olefínico y de los metilos

angulares correspondientes) y la presencia del isómero $\Delta^{8(14)}$ (valores de desplazamiento químico de los metilos angulares coincidentes con los indicados en tablas⁶⁸).

D - OBTENCION DEL 20-CETO PREGNANO A PARTIR DEL ACIDO ETIANICO

Tal como se planteó anteriormente, el objetivo de esta etapa era la construcción de una cadena lateral del tipo 20-ceto pregnano a partir del ácido etiánico resultante del proceso de degradación. Durante esta modificación se introduciría la marcación isotópica que finalmente quedaría localizada en el carbono 21 de la molécula.

Esta conversión puede realizarse de varias formas diferentes. Una de las primeras que se analizó consistía en la reacción del ácido etiánico correspondiente con metil litio⁷⁰, pero no se tenía la certeza de poder usar condiciones equimoleculares de ácido a metil litio por lo que en principio fue dejada de lado.

En trabajos más recientes, Cahiez y colaboradores^{71,72} mostraron la utilidad de los reactivos organomanganesianos en la síntesis de cetonas a partir de haluros de ácido, con la ventaja de emplear una relación 1:1 de monoalquilman-ganesiano (RMnI) a sustrato. Estos autores aplicaron la técnica en el campo de los esteroides⁷³ y según sus comentarios la reacción conducía al producto con rendimientos mejores que los obtenidos con métodos que usaban otros metales como cadmio, zinc, aluminio o mercurio. Además, el reactivo yoduro de alquilmanganeso era estable a temperatura ambiente y comparado con los compuestos alquil-líticos o alquilmagnésicos era más selectivo; la molécula del sustrato podía tener grupos formiloxi, acetoxi o carbonílicos que no eran atacados por el reactivo. Este último hecho permitía, por ejemplo, una acetilación como reacción de

protección del hidroxilo de carbono 3.

Independientemente de estos comentarios, también se tuvo en cuenta que Mac Phillamy y Scholz⁷⁴ sintetizaron $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -acetoxipregn-5-en-20-ona (76) con el método general para la preparación de cetonas desarrollado por Gilman y Nelson⁷⁵ que emplea derivados organocádmicos. Este método se había aplicado con éxito en la síntesis de esteroides⁷⁶ pero usando un gran exceso de reactivo de Grignard. Los autores mejoraron la técnica y obtuvieron el compuesto 76 con 50% de rendimiento, empleando cantidades equimoleculares de yoduro de metilo y cloruro de ácido.

Si bien esta adaptación podía servir a los fines buscados en el sentido que la relación esteroide:reactivo lograda era 1:1, las cantidades con las que trabajaron los autores y las disponibles en el presente trabajo diferían, por lo menos, en un factor de 10.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que los precursores a sintetizar iban a ser utilizados en estudios biosintéticos en los que interesa emplear compuestos con una elevada actividad específica, lo que implicaba la menor dilución posible del reactivo marcado.

Además, en especial en la síntesis a partir de ácido quenodesoxicólico, el número de pasos impedía llegar al ácido etiánico con una masa elevada de producto. Por lo tanto era necesario condicionar los procedimientos usados por los autores a las necesidades de la presente síntesis.

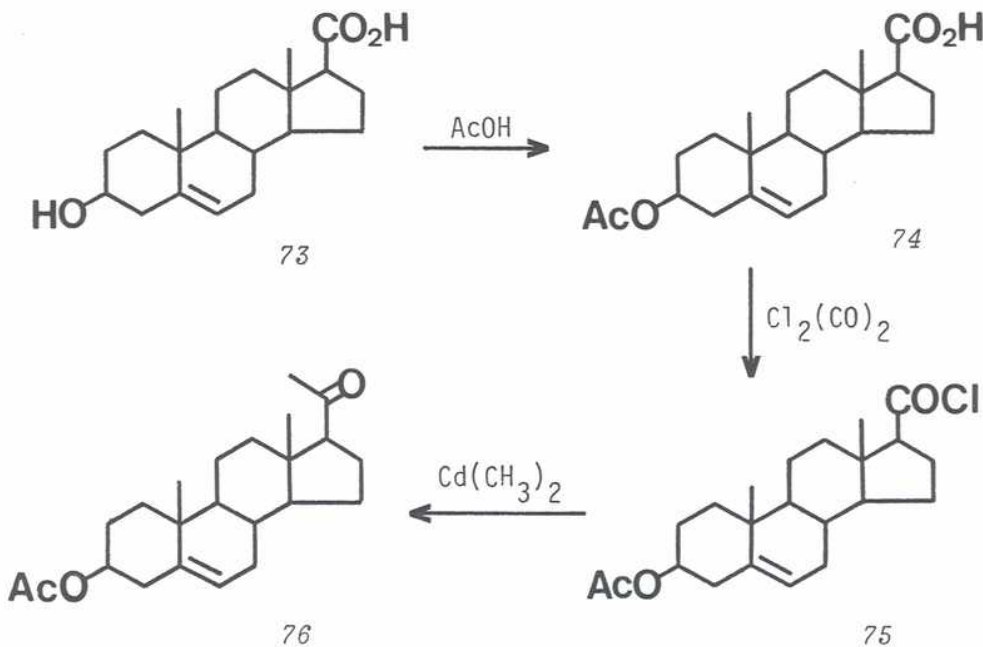
Resumiendo estos datos se decidió probar los dos últimos métodos:

- Reacción con un monoalquilmanganesiano
- Reacción con un dialquilmcadmio

Tal como se indicó anteriormente, se decidió usar para los ensayos previos un ácido comercial. Se eligió el ácido 3 β -hidroxiandroster-5-en-17 β -carboxílico (73) que sólo difería de los ácidos etiánicos a sintetizar en el doble enlace de la posición 5 y en la ausencia del doble enlace de la posición 8(14), considerándose que estas características estructurales no interferirían en el desarrollo de la reacción.

Para hacer cualquiera de las dos pruebas eran necesarias dos etapas previas: la protección del alcohol y la formación del cloruro de ácido.

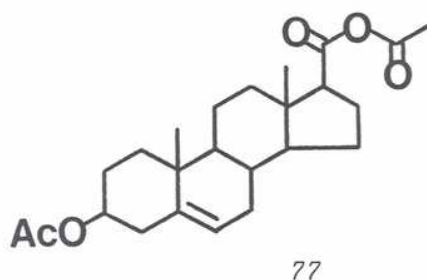
La serie de pasos ensayados figuran en el siguiente esquema.



Esquema 17: Obtención del 20-ceto pregnano a partir del ácido etiánico.

- Obtención del ácido 3 β -acetoxiandroster-5-en-17 β -carboxílico (74)

Debido a que el hidroxilo de carbono 3 no presentaba impedimento estérico se utilizó una técnica de acetilación sencilla. Se empleó una mezcla de anhídrido acético y piridina (1:1) y se desarrolló la reacción a temperatura ambiente. Sin embargo no se obtuvo el resultado esperado ya que además de la esterificación, se formó el anhídrido mixto (77) con el grupo carboxilo de carbono 17.



Ante este hecho se varió la proporción de la mezcla de reactivos, disminuyendo la cantidad de anhídrido acético. El análisis por ccd indicó la presencia de mezclas de productos entre los que se encontraba, en algunos casos, el ácido de partida.

Se cambió el medio de reacción efectuando la acetilación con anhídrido acético y catálisis de ácido clorhídrico, pero el resultado fue el mismo.

Dado que el anhídrido se obtenía muy fácilmente, se trató de realizar su hidrólisis en condiciones suaves, empleando piridina acuosa a 90°C. Sin embargo ello no condujo al derivado necesario para la síntesis.

Finalmente se sometió el compuesto 73 a un tratamiento con ácido acético a reflujo durante 72 horas, luego de las cuales se logró la completa transformación del esteroide de partida en el producto acetilado 74.

- Obtención del cloruro de 3 β -acetoxiandroster-5-en-17 β -carboxililo (75).

Para este paso se eligió como halogenuro de ácido el cloruro de oxalilo.

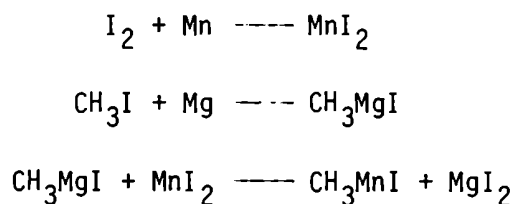
Luego de suspender el ácido etiánico en benceno anhidro, se agregó el cloruro de oxalilo. Se obtuvo rápida y fácilmente el cloruro del ácido etiánico con muy buen rendimiento.

El compuesto se usó sin purificación previa.

- Obtención de 3 β -acetoxi-pregn-5-en-20-ona (76).

- Reacción con un monoalquilmanganesiano.

Preparación del reactivo:



El primer paso consistió en la preparación del ioduro manganesoso por reacción directa del iodo con manganeso en éter anhidro. Luego se preparó el reactivo de Grignard usando ioduro de metilo y limaduras de magnesio en éter.

La reacción de intercambio de metal se efectuó mezclando un equivalente de ioduro manganesoso con un equivalente del reactivo de Grignard. La mezcla se realizó a -20°C apreciándose la aparición de una suspensión amarilla de ioduro de

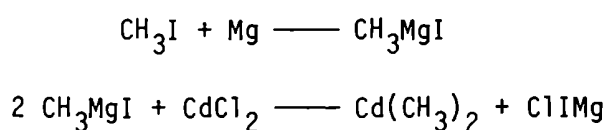
metilmanganeso.

Desarrollo de la reacción:

La reacción se inició por agregado de una solución bencénica del cloruro de ácido a la suspensión etérea de ioduro de metilmanganeso.

Se hicieron varias pruebas, pero los resultados no fueron los esperados ya que la conversión a metilcetona dio rendimientos muy bajos. Estos no mejoraron prolongando el tiempo de reacción.

- Reacción con un dialquilmanganeso.



Se preparó el reactivo de Grignard con ioduro de metilo y limaduras de magnesio en éter anhidro. Luego de 2 horas de reacción, cuando la formación del reactivo se completó, se agregó el cloruro de cadmio finamente pulverizado y anhidro.

El ioduro de metilo radiactivo se provee comercialmente en tubos de vidrio de aproximadamente 20 cm de largo, divididos por la mitad con una débil pared de vidrio que se rompe en el momento de la reacción. De esta manera se libera el compuesto. Teniendo en cuenta el condicionamiento que presentaba no sólo el pequeño volumen de ioduro de metilo sino también las características particulares del envase que lo contenía, la reacción se probó usando dos procedimientos diferentes.

En un primer intento se preparó el reactivo de Grignard en un tubo de dimensiones similares a las de aquéllos en los que se provee el ioduro de metilo radiactivo, pero sin la división en la mitad (figura 1b). Se hizo esta prueba con la idea de realizar la experiencia definitiva en el mismo recipiente donde venía envasado el compuesto marcado. Una vez finalizada la formación del reactivo, se lo trasvasó con una jeringa a un balón que contenía el cloruro de cadmio. En ese mismo balón, que estaba cerrado con un tapón de látex, se inyectó posteriormente el cloruro de ácido esteroideal.

Para la segunda prueba se diseñó el equipo que se indica en la figura 1a. La reacción de Grignard se desarrolló en el tubo kitasato y durante el transcurso de la misma se liberaría el ioduro de metilo radiactivo encerrado en el tubo invertido. Debido a que durante las pruebas no se empleó el compuesto isotópicamente marcado, se usó el mismo equipo pero con un tubo invertido sin división (figura 1b). Una vez que se completó la formación del ioduro de metilmagnesio y actuando en atmósfera de nitrógeno, se sacó el tubo invertido, se agregó el cloruro de cadmio y se tapó el tubo kitasato con un tapón de vidrio. La suspensión final se agitó para formar el compuesto organocádmico y una vez formado se agregó el cloruro de ácido esteroideal inyectándolo a través del tapón de látex de la salida lateral del tubo kitasato.

Este procedimiento es el que finalmente se adoptó por el rendimiento de la reacción con el compuesto organocádmico y por la comodidad del procedimiento empleado.

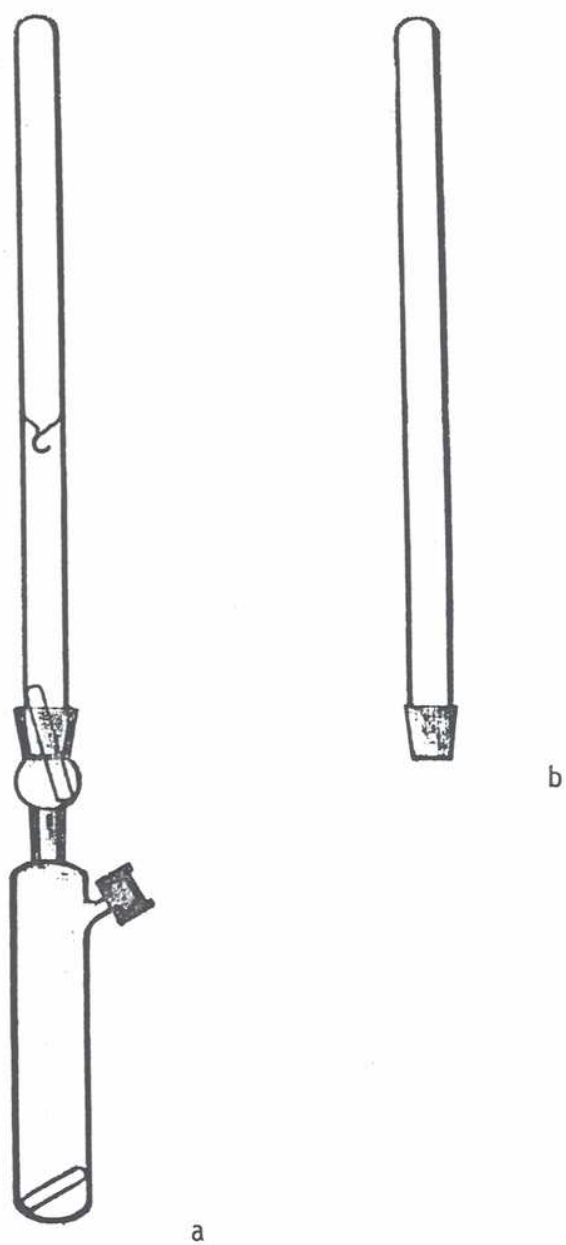


Figura 1: Equipo empleado para la preparación de 20-ceto pregnanos a partir de los cloruros de ácidos correspondientes.

La diferencia entre estas pruebas y los ensayos definitivos radicaba en la necesidad de liberar el yoduro de metilo radiactivo durante el transcurso de la reacción de Grignard. Por ello en la siguiente experiencia se inició la formación del reactivo con la mitad del halogenuro de alquilo a usar. Después de media hora de iniciada la reacción, se enfrió la parte inferior del tubo kitasato a la temperatura del aire líquido y se agregó el resto del yoduro de metilo. Se dejó que subiera la temperatura hasta alcanzar la ambiente y se continuó con la agitación. De esta manera se comprobó que el resultado era el mismo que el que se había obtenido cuando no se había disminuído la temperatura del medio. Por lo tanto, se podía usar este cambio de temperatura para facilitar el contacto del yoduro de metilo radiactivo con la mezcla de reacción sin que se afectara el resultado final del proceso.

Esta técnica se probó usando cantidades equivalentes a las que se emplearían para las síntesis de las metilcetonas 19 y 38 lográndose rendimientos máxicos prácticamente iguales.

E - SINTESIS TOTAL DE $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -HIDROXI-5 β -PREGN-8(14)-EN-20-ONA

Sobre la base de los datos anteriormente obtenidos la secuencia sintética elegida fue la siguiente:

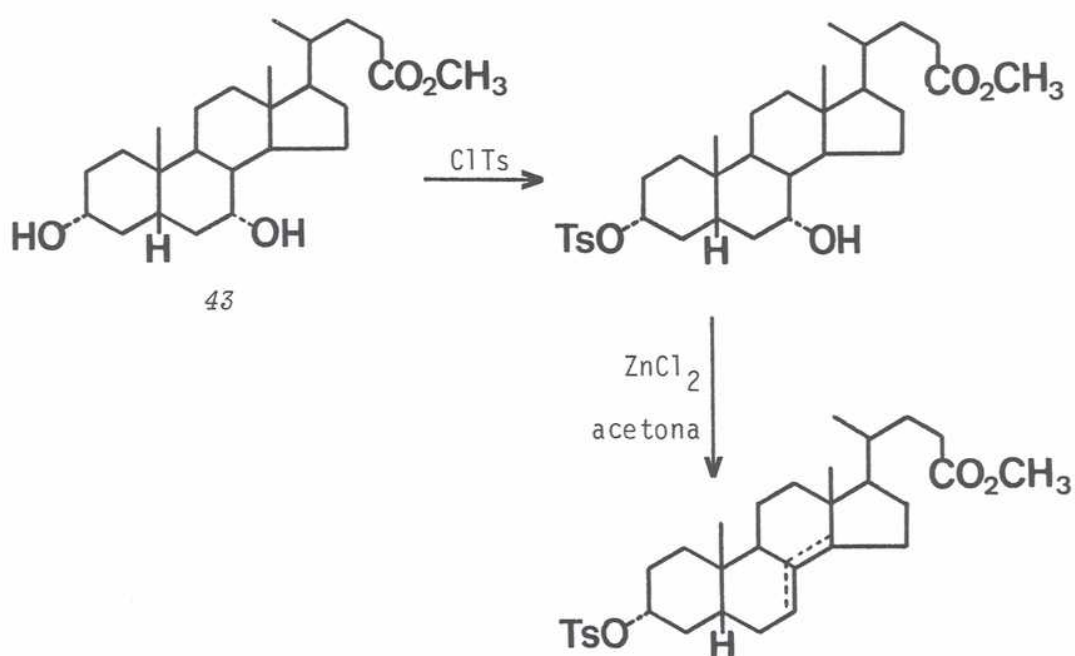
- Degradación de la cadena lateral del ácido biliar a una cadena lateral del tipo ácido etiánico.
- Deshidratación del hidroxilo de carbono 7 e isomerización del doble enlace formado a la posición 8(14).
- Inversión de la configuración del carbono 3.
- Construcción de la nueva cadena lateral del tipo 20-ceto pregnano.

La primer etapa sería la degradación de la cadena lateral para llegar a la del ácido etiánico. La protección selectiva del hidroxilo de carbono 3 en presencia del de carbono 7 es factible debido al impedimento estérico que presenta este último para la entrada de sustituyentes voluminosos. Como esa protección selectiva se había probado previamente con el hidroxilo de carbono 3 orientado hacia el lado α de la molécula, resultaba conveniente deshidratar el hidroxilo de carbono 7 antes de invertir la configuración del carbono 3. El último paso sería el armado de la cadena de tipo pregnano, con la consecuente introducción de la marcación isotópica.

La secuencia sintética discutida anteriormente fue elegida luego de realizar dos ensayos para ver si existía la posibilidad de acortar el camino sintético. El primero consistía en deshidratar el hidroxilo de carbono 7 protegiendo el de carbono 3 con un grupo tosilato. Esto evitaría la succinilación, hidrólisis

sis del grupo succinilo luego de deshidratar y posterior tosilación en carbono 3.

Pese a que el grupo tosilo resulta ser un muy buen grupo saliente, se intentó verificar la aplicabilidad de esta variante. Se llevaron a cabo las transformaciones indicadas en el siguiente esquema



Esquema 18: Uso de un tosionato como grupo protector para la reacción de deshidratación.

La tosilación del quenodesoxicolato de metilo (43) se realizó con la misma técnica usada previamente para el litocolato de metilo (pág. 53) y con un rendimiento igualmente satisfactorio. La deshidratación posterior se hizo con cloruro de zinc en las condiciones determinadas anteriormente para el compuesto

70 (pág. 63).

El espectro de RMN- ^1H del producto final obtenido no presentaba la señal correspondiente al hidrógeno 7β pero tampoco presentaba las señales correspondientes a hidrógenos sobre carbonos aromáticos o al hidrógeno de carbono 3 unido a un hidroxilo ecuatorial. En cambio se vieron varias señales olefínicas complejas a 5,1 , 5,3 y 5,6 ppm. Por otro lado el espectro IR no era el de un esteroide ni con hidroxilos libres ni con grupos aromáticos.

Estos hechos permitieron confirmar que durante el transcurso de la reacción no sólo se había deshidratado el hidroxilo de carbono 7 sino que además se había eliminado el tosilato, lo que descartaba la posibilidad de usarlo como grupo protector.

La otra variante consistía en invertir la configuración del carbono 3 y emplear el esteroide con el hidroxilo con orientación β , protegido como formil derivado, como sustrato para la deshidratación.

Para analizar esta alternativa se trató el 3β -formoxi- 5β -colan-24-oato de metilo (68) con cloruro de zinc en acetona, en las condiciones de la reacción de deshidratación (pág.63). El producto aislado luego de dos horas de tratamiento se analizó por ccd, comprobándose que el reactivo de partida había desaparecido y observándose fundamentalmente una mancha de R_f mayor. Esta mancha coincidía con la del producto lateral de la reacción de inversión de configuración (producto de la eliminación del grupo tosilato) en distintos sistemas cromatográficos probados. Su espectro de RMN- ^{13}C no presentó la señal del carbono

3 sustituido en β con un formiato, pero en cambio tenía señales de carbonos olefínicos a 156,17 , 132,32 , 128,65 y 124,22 ppm.

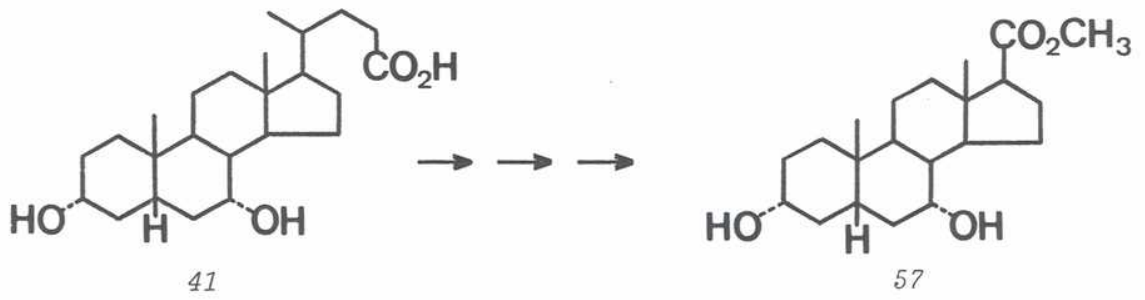
Este compuesto se hidrolizó con hidróxido de potasio en etanol a reflujo durante dos horas y el hidrolizado se metiló con diazometano. El espectro IR del esteroide sometido a este tratamiento no presentaba señales de hidroxilos libres y además el análisis por ccd demostró que su Rf era el mismo que el del compuesto sin tratar.

Estos resultados permitieron concluir que el grupo formiato no soportaba las condiciones de deshidratación.

Descartada la posibilidad de introducir las dos modificaciones discutidas, se comenzó el trabajo de síntesis total. Se aplicaron las reacciones que previamente se habían probado sobre los sustratos modelo (ácido quenodesoxicólico y ácido litocólico) encadenándose en la secuencia indicada en la página 76. Se discuten a continuación las experiencias llevadas a cabo para obtener la cetona 38.

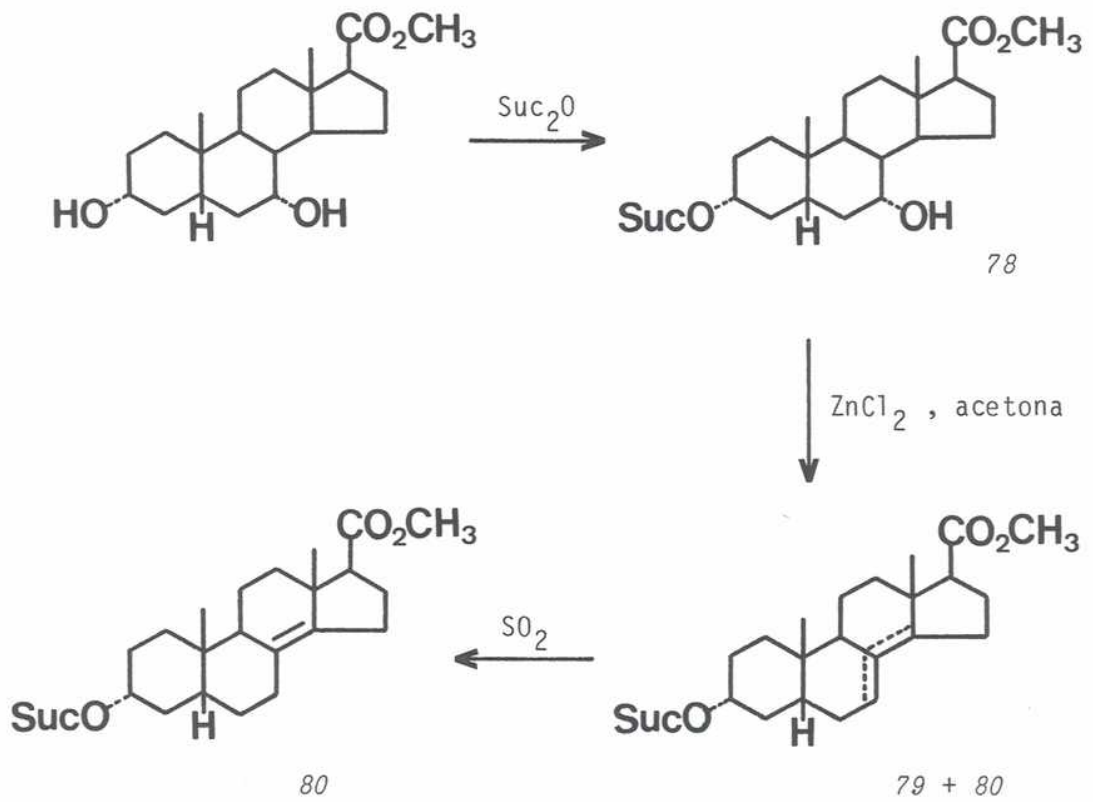
E1 - DEGRADACION DEL ACIDO BILIAR AL ACIDO ETIANICO

Esta primera etapa de la síntesis se realizó tal como se había efectuado en los ensayos de degradación ya que tanto el producto de partida como el final eran los mismos. Se obtuvo así el 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (57).



E2 - DESHIDRATACION DEL HIDROXILO DE CARBONO 7 E ISOMERIZACION DEL DOBLE

ENLACE FORMADO A LA POSICION 8(14)



La succinilación se realizó en las mismas condiciones que se habían usado previamente y con rendimientos similares, pero en cambio la reacción de deshidratación con cloruro de zinc no dio resultados satisfactorios. Su aplicación, tal como se había descrito para el compuesto 70, dejaba la mayor parte del alcohol sin reaccionar. Paulatinamente se fue aumentando la cantidad de agente deshidratante y el tiempo de calentamiento. La evolución de la reacción se siguió por ccd observándose la aparición de dos manchas principales, una de mayor y otra de menor R_f que el esteroide de partida. Cuando se comprobó la desaparición de este último se consideró finalizada la reacción, extrayéndose los productos de la misma. Se metiló la mezcla extraída y se determinó por IR y ccd que se había producido una hidrólisis parcial de los grupos éster presentes, debido a que el aumento de la cantidad de cloruro de zinc aumentó la basicidad del medio de reacción lo suficiente como para producir la hidrólisis mencionada. Además se verificó que la reacción no había concluido ya que parte del alcohol de partida aún no se había deshidratado.

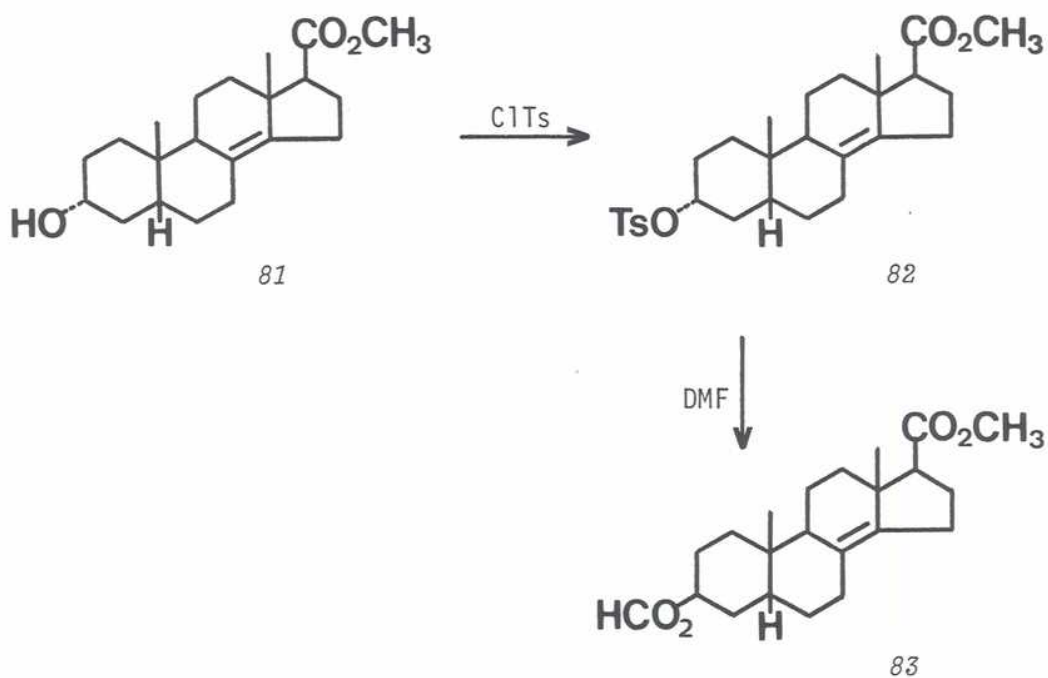
Se repitió el proceso para determinar la cantidad de cloruro de zinc necesaria para realizar la deshidratación en el caso del ácido etiánico, que resultó ser mucho mayor que la necesaria para deshidratar el derivado del ácido biliar (70).

Una vez optimizadas las condiciones para este nuevo sustrato, la mezcla de productos aislada se metiló por tratamiento con diazometano. Estos productos, tal como ocurrió en los ensayos previos, resultaron ser una mezcla de las ole-

finas con el doble enlace en las posiciones 7 (79) y 8(14) (80). Fue necesario por lo tanto hacer la isomerización para transformar el compuesto 79 en 80.

La técnica elegida en las etapas previas consistía en un calentamiento de la mezcla con dióxido de azufre (pág. 65). Sin embargo, un importante riesgo de esta reacción radica en la explosión del tubo al ser calentado, con la consiguiente pérdida de la muestra. Es por esto que, pensando en la trabajosa preparación del esteroide, se decidió separar las olefinas para someter a la reacción de isomerización solamente el compuesto insaturado en posición 7, minimizando de esta forma las posibles pérdidas. Como no se pudieron separar por ccd se recurrió a la cromatografía líquida de alta resolución con la que se logró el objetivo buscado.

En lo que respecta a la reacción de isomerización, se debió modificar el tiempo de calentamiento ya que, según pudo comprobarse por RMN- ^1H , un tratamiento de 24 horas como el usado para el derivado del ácido quenodesoxicólico (71) resultó insuficiente. La isomerización del doble enlace se completó en 36 horas con el consecuente aumento en la cantidad de productos alquitranosos obtenidos como subproductos de la reacción. Este hecho ya había sido informado en la literatura previamente.

E3 - INVERSION DE LA CONFIGURACION DEL CARBONO 3

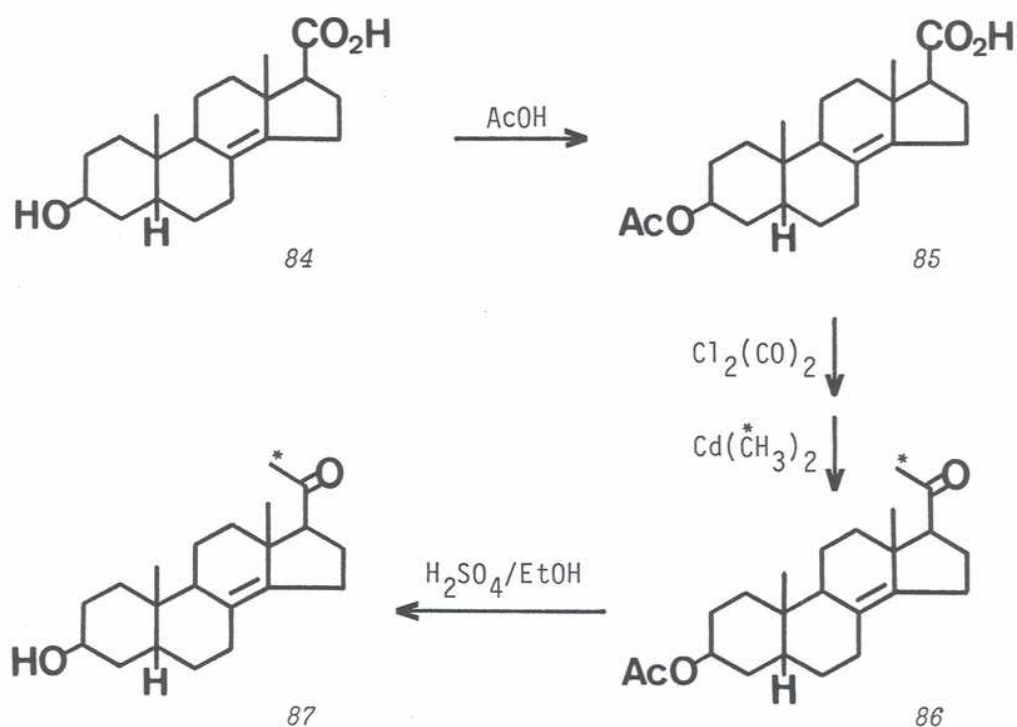
El compuesto 80 se sometió a una reacción de saponificación con la cual se liberó el hidroxilo de carbono 3 que, luego de una metilación con diazometano, se tosiló con cloruro de p-toluensulfonilo. El tratamiento con N,N-dimetilformamida invirtió la configuración de ese centro asimétrico. Para los dos últimos pasos las técnicas usadas fueron las mismas que las elegidas en las pruebas previas (pág. 53).

El producto resultante de la reacción de inversión debió purificarse por recristalización, ya que por cromatografía de adsorción en silicagel se producía la hidrólisis casi completa del éster del ácido fórmico. Este fue el resultado

obtenido cuando se purificó el formil derivado (83) usando una columna cromatográfica con el adsorbente indicado y cloroformo como solvente de elución. El esteroide tratado de esta manera presentó en el espectro IR una banda de tensión O-H a 3400 cm^{-1} . Por otro lado, en el espectro de RMN- ^1H no se observó la señal del hidrógeno del formilo a 8,07 ppm, pero se encontró la del éster metílico del ácido etiánico a 3,68 ppm indicando que este último no se afectó por el mencionado procedimiento.

Teniendo en cuenta este resultado, cuando se repitió este paso de síntesis se purificó el producto por recristalización de metanol.

E4 - OBTENCION DEL 20-CETO PREGNANO A PARTIR DEL ACIDO ETIANICO



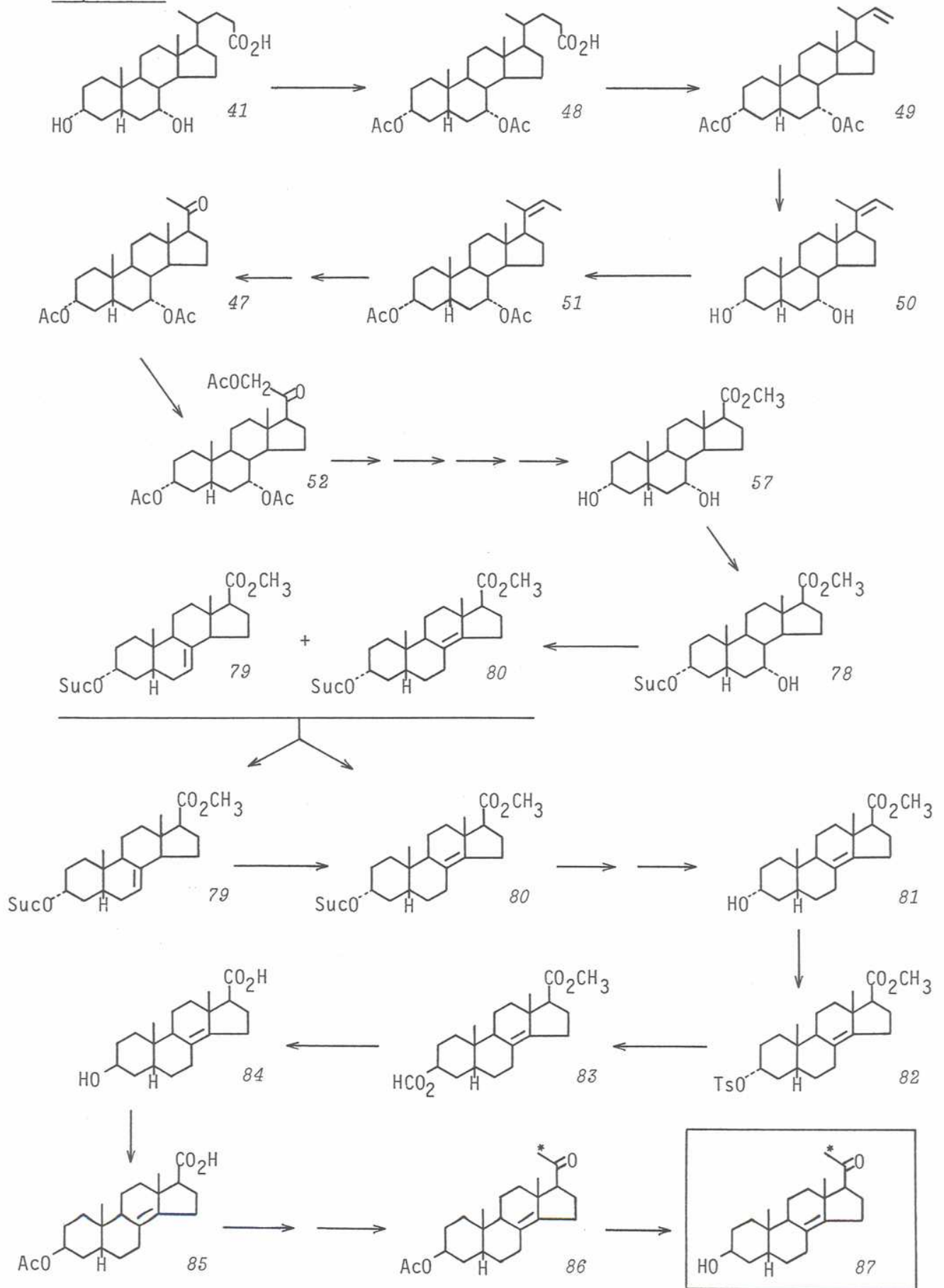
El compuesto *83* se saponificó y el ácido resultante *84* se acetiló con ácido acético a reflujo, tal como se había determinado en los ensayos previos.

La cantidad final de ácido acetilado sólo alcanzó a 15 mg (0,04 mmoles) los que se sometieron a la reacción con dimetilcadmio.

Debido a la baja cantidad de ácido obtenida se desarrolló solamente la síntesis radiactiva. Luego de la purificación del producto crudo de reacción se separaron 5 mg de la metilcetona *86* con una actividad específica de $2,25 \times 10^7$ dpm/mg u $8,05 \times 10^9$ dpm/mmol ó 3,66 mCi/mmol.

El compuesto *86* se hidrolizó y el alcohol resultante, luego de la purificación correspondiente, mantuvo la actividad específica anterior: $2,54 \times 10^7$ dpm/mg u $8,02 \times 10^9$ dpm/mmol. Este era el producto final de una de las síntesis y uno de los esteroides a usar en los ensayos de inoculación. Se indica a continuación el esquema completo para su preparación.

Esquema 19:



F - SINTESIS TOTAL DE 3 β -HIDROXI-5 β -PREGNAN-20-ONA

Para la síntesis de $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (19) se realizó, a partir del ácido litocólico (42), una secuencia de reacciones análoga a la descrita para la síntesis del derivado del ácido quenodesoxicólico.

Los resultados y rendimientos obtenidos fueron similares.

En todos los casos en que los reactivos usados fueron los mismos, la relación estequiométrica empleada se mantuvo aproximadamente igual.

El esquema de la síntesis completa se encuentra en la página 90.

F1 - DEGRADACION DEL ACIDO BILIAR AL ACIDO ETIANICO

El ácido litocólico sólo presenta un hidroxilo en carbono 3 y su protección se pudo realizar en condiciones más suaves que las usadas previamente. Para ello se trató el esteroide con una mezcla de anhídrido acético y piridina durante 24 horas, a temperatura ambiente, lográndose con este método una acetilación completa.

La descarboxilación oxidativa se efectuó con tetraacetato de plomo y la misma catálisis empleada previamente (acetato de cobre y piridina). Esto condujo al acetato de 24-nor-5 β -col-22-en-3 α -ol (89).

El tratamiento con N-litioetilendiamina permitió isomerizar el doble enlace de la posición 22 a la 20(22). Como era previsible, además del desplazamiento del doble enlace, el medio básico de esta reacción hidrolizó el éster de carbono 3. Por este motivo se repitió la acetilación procediéndose nuevamente de la

manera indicada para el caso del ácido litocólico y aislándose el acetato de 24-nor-5 β -col-20(22)-en-3 α -ol (91) con óptimos rendimientos. La ozonólisis de la olefina rindió la 3 α -acetoxi-5 β -pregnan-20-ona (92).

En la etapa siguiente por acetoxilación de la cetona con tetraacetato de plomo se obtuvo la 3 α ,21-diacetoxi-5 β -pregnan-20-ona (93) y una hidrólisis ácida condujo a la 3 α ,21-dihidroxi-5 β -pregnan-20-ona (94).

En la síntesis descrita a partir del ácido quenodesoxicólico, la hidrólisis ácida conducía a una mezcla de compuestos, ya que el hidroxilo de carbono 7 se liberaba sólo en una muy pequeña proporción. Esto obligaba a realizar los dos pasos siguientes con los dos productos (7 α -hidroxi y 7 α -acetoxi derivados) simultáneamente. Ya que el sustrato homólogo de esta síntesis no tenía la sustitución en carbono 7, esta dificultad no se presentó y en las condiciones de la hidrólisis se obtuvo únicamente la α -hidroxicetona 94.

El tratamiento con periodato de sodio y una posterior metilación con diazometano permitió separar el 3 α -hidroxi-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (95) con el que finalizaba la secuencia de degradación.

F2 - INVERSION DE LA CONFIGURACION DEL CARBONO 3

Por reacción del compuesto 95 con cloruro de p-toluensulfonilo se preparó el 3 α -tosiloxi-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (96). El desplazamiento del grupo tosilo del carbono 3 con N,N-dimetilformamida invirtió la configuración de ese centro asimétrico formándose el 3 β -formiloxi-5 β -androstan-17 β -carbo-

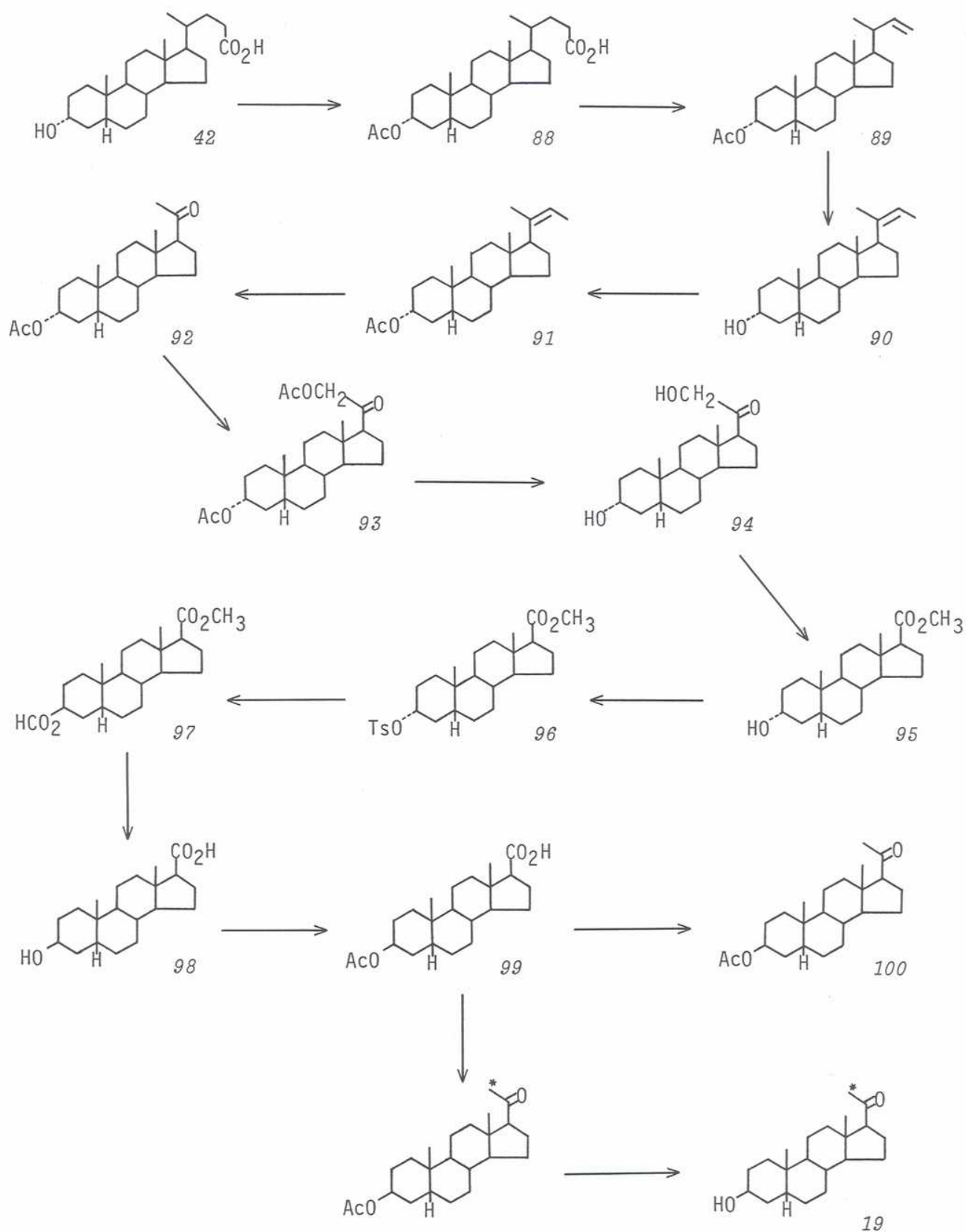
xilato de metilo (97).

El paso siguiente consistió en la saponificación del compuesto 97 con el fin de liberar el ácido. Como simultáneamente se desprotegió el hidroxilo de carbono 3, se procedió a reacetilar usando ácido acético a reflujo de acuerdo con el método elegido en los ensayos previos. Así se obtuvo el ácido 3 β -acetoxi-5 β -androstan-17 β -carboxílico (99).

F3 - OBTENCION DEL 20-CETO PREGNANO A PARTIR DEL ACIDO ETIANICO

Se reprodujeron exactamente las mismas condiciones usadas con una masa equivalente del reactivo de prueba (74) lográndose en este caso un resultado similar. De esta manera se preparó primero la 3 β -acetoxi-5 β -pregnan-20-ona (100) y posteriormente el mismo producto marcado en carbono 21 con ^{14}C . El rendimiento final de ambas preparaciones fue similar. El compuesto radiactivo presentó la siguiente actividad específica: $8,72 \times 10^6$ dpm/mg ó $3,14 \times 10^9$ dpm/mmol ó 1,42 mCi/mmol.

La hidrólisis ácida de estas cetonas condujo a la 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (19) y la $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona cuya actividad específica resultó ser $10,12 \times 10^6$ dpm/mg ó $3,22 \times 10^9$ dpm/mmol ó 1,46 mCi/mmol. Esta última fue usada en los ensayos de inoculación.



Esquema 20: Síntesis total de 3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona

INOCULACION DE LOS PRODUCTOS RADIATIVOS

A PLANTAS DE *D. PURPUREA*.

CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

Las semillas se sembraron en almácigos que se mantuvieron húmedos constantemente. Después de la aparición de los cotiledones, las plantículas se colocaron en otro almácigo para aislarlas de las semillas sin germinar y ubicarlas con una separación de 5 cm entre cada una.

Hasta los 45 días las plantas recibieron sol a través de un vidrio y en ese momento se transplantaron a macetas. El resto del crecimiento se desarrolló al aire libre.

ADMINISTRACION DE LOS PREGNANOS RADIATIVOS (COMPUESTOS 19 Y 38).

Se usaron seis plantas de *D. purpurea* de tres meses. Cada planta tenía entre cuatro y seis hojas y en todas se observaban hojas pequeñas en etapa de crecimiento.

Se eliminó la tierra de la superficie de las hojas con agua. Después que el agua se había evaporado se limpiaron las hojas con un algodón embebido en acetona.

Se disolvieron 2 mg de $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (19) de actividad específica $10,12 \times 10^6$ dpm/mg en 25 ml de etanol. Se tomó 0,1 ml de esa solución para medir radiactividad y 1 ml de la misma para inocular. Este último se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en 600 μl de etanol. Esta solución más concentrada se aplicó con un tubo capilar de vidrio sobre la superficie de las hojas de tres plantas, tratando de distribuirla equitativamente y en forma

preferencial sobre las hojas más tiernas. El recipiente se lavó dos veces con 200 μ l de etanol cada una, agregando las soluciones de lavado sobre la superficie de las hojas de las mismas plantas y en la misma forma.

Se pesó 1 mg de $|21-^{14}\text{C}|$ 3 β -hidroxi-5 β -pregn-8(14)-en-20-ona (38) de actividad específica $25,40 \times 10^6$ dpm/mg y se disolvió en 10 ml de etanol. Se separaron 50 μ l de esa solución para medir radiactividad y 1 ml de la misma se evaporó a sequedad. El residuo obtenido se redisolvió en 400 μ l de etanol y se aplicó sobre la superficie de las hojas de otras tres plantas en forma similar al caso anterior. También se lavó el recipiente dos veces con 200 μ l de etanol cada vez, agregando las soluciones de lavado a la superficie de las hojas de las plantas inoculadas con este precursor.

Los datos se encuentran resumidos en la tabla 1 de la página 103.

DURACION DE LAS EXPERIENCIAS

Las plantas inoculadas fueron mantenidas al aire libre, evitando que se mojaran las hojas.

Los períodos de cada experiencia fueron de 4, 9 y 14 días.

Al finalizar cada período se extrajo la parte aérea de una de las tres plantas inoculadas con $|21-^{14}\text{C}|$ 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona y de una de las tres inoculadas con $|21-^{14}\text{C}|$ 3 β -hidroxi-5 β -pregn-8(14)-en-20-ona.

EXTRACCION DEL MATERIAL VEGETAL (Procedimiento general)

Una vez completado el período correspondiente, se cortaron las hojas y se lavaron con etanol en forma abundante. La solución resultante del lavado de las hojas de cada planta se colocó en un matraz aforado de 100 ml y se completó el volumen con etanol. Se tomó 1 ml de esa solución para medir radiactividad.

Las hojas de la planta en estudio se cortaron en trozos pequeños y se trituraron en un mortero. El material vegetal se extrajo seis veces con 15 ml de etanol cada una, obteniéndose finalmente un residuo fibroso de color pardo claro. La solución alcohólica se evaporó a sequedad y el extracto se redisolvió en etanol y se colocó en un matraz aforado de 10 ml. Una vez completado el volumen del matraz, se tomó 0,5 ml de la solución para medir radiactividad y el resto se concentró para su tratamiento posterior.

ASLAMIENTO DE LOS CARDENOLIDOS (Procedimiento general)

Al extracto vegetal concentrado de cada planta se agregaron 4 mg de digitoxina, 2 mg de digoxina y 2 mg de gitoxina.

La nueva mezcla se purificó por ccd preparativa de silicagel, usando para el desarrollo de la misma una mezcla de cloroformo-etanol (93:7). En estas condiciones se separa la digitoxina con $R_f=0,5$ y la mezcla de digoxina y gitoxina con $R_f=0,3$.

Se eluyeron las dos zonas mencionadas de la placa y las dos soluciones resultantes se colocaron en dos matraces aforados de 25 ml cada uno, enrasando a

volumen con etanol. De cada uno de ellos se tomó una alícuota de 3 ml para medir radiactividad.

Un volumen medido del resto de la solución del matraz que contenía la digitoxina se evaporó a sequedad y al residuo se agregó una cantidad adicional conocida de digitoxina (ver tablas 3 y 6 de las páginas 104 y 106).

La mezcla así preparada se recrystalizó con etanol acuoso hasta actividad constante.

SEPARACION DE DIGOXINA Y GITOXINA (Procedimiento general)

La solución alcohólica que contenía la mezcla de digoxina y gitoxina, obtenida luego del aislamiento de los cardenólidos radiactivos, se evaporó a sequedad. El extracto se redisolvió en una pequeña cantidad de alcohol y se separó por ccd preparativa usando cloroformo-etanol (85:5) como solvente de desarrollo.

Se eluyeron las zonas de la placa que contenían los glicósidos y las soluciones se colocaron en matraces aforados de 10 ml. Luego de enrasar con etanol se tomó 1 ml de cada uno para medir radiactividad.

Las soluciones se evaporaron a sequedad y a cada extracto se agregó una cantidad conocida del cardenólido correspondiente (ver tabla 8 de la página 107).

Las dos mezclas resultantes se recrystalizaron de etanol acuoso hasta actividad constante.

OBTENCION DE DIGITOXIGENINA

Se disolvieron 26 mg de digitoxina (masa aislada de la planta + masa agre-

gada para diluir) en 10 ml de metanol. Se agregaron 0,03 ml de ácido sulfúrico (c) y se calentó a reflujo durante 20 minutos.

El desarrollo de la reacción se siguió por ccd (solvente de desarrollo: cloroformo-etanol 95:5) observándose a los 20 minutos la desaparición de digitoxina y la presencia de digitoxigenina como producto principal.

El extracto metanólico se volcó sobre 20 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (2x40 ml). La fase orgánica se lavó con 10 ml de agua. Las soluciones acuosas de lavado se reunieron y se separó la mitad para medir radiactividad.

El extracto orgánico se secó, se utilizaron 8 ml para medir radiactividad y el resto se evaporó. El residuo obtenido se recrystalizó de etanol acuoso hasta actividad constante.

ESPECTROSCOPIA DE

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE ^{13}C

APLICADA A DERIVADOS 5β -ESTEROIDALES

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C resulta una técnica de mucha utilidad para la elucidación estructural de compuestos orgánicos. En especial en el campo de los esteroides, un gran número de trabajos avalan dicha hipótesis⁷⁷⁻⁸⁵. Sin embargo, es necesaria una considerable cantidad de correlaciones entre valores de desplazamiento químico antes de que sea posible predecir el espectro de ^{13}C de una dada estructura esteroideal, y es en ese sentido que la comparación con análogos esteroidales resulta de mucho valor.

En el curso del presente trabajo de síntesis de 5β -pregnanos a partir de ácidos biliares, se efectuaron los espectros de RMN- ^{13}C de los compuestos sintetizados. Como los derivados 5β -esteroidales no son naturales, en literatura no existen demasiados datos para ellos. Por este motivo se consideró importante la contribución que se pudiera hacer, y orientado hacia este objetivo, fue necesaria la asignación de compuestos modelo algunos de los cuales resultaron disponibles comercialmente mientras que otros debieron ser sintetizados tal como se describe en la página 151.

Con estos compuestos estructuralmente relacionados fue posible efectuar asignaciones satisfactorias de casi todos los desplazamientos químicos de los carbonos de los compuestos estudiados.

La correlación de los datos obtenidos permitió analizar el efecto producido por cambios configuracionales y funcionales en carbono 3, por la introducción de un doble enlace en la posición 8(14) y por la presencia de diferentes cadenas laterales. Por otro lado, se pudo predecir el conformero favorecido que

adoptan en solución los ácidos biliares.

Los datos de desplazamiento químico para los carbonos de los productos estudiados se presentan en las tablas 9 y 10. Las asignaciones correspondientes a cada carbono se confirmaron por el análisis de los respectivos espectros de desacople selectivo fuera de resonancia, por la técnica de ecos de spin con desacople alternado (denominado comunmente APT: test de protones vecinales), por comparación con datos de compuestos modelo y por comparación con valores calculados considerando las reglas semiempíricas de Beierbeck, Saunders y Ap Simon⁸⁶. Estos autores establecieron parámetros para la determinación de los desplazamientos químicos en el caso de hidrocarburos saturados, alcoholes, aminas, cetonas y olefinas, aplicables a moléculas cíclicas que existen en conformaciones rígidas formando ángulos diedros de 60°.

A continuación se indican los parámetros usados en el presente análisis y la forma en que, según Beierbeck y colaboradores, deben calcularse los valores de desplazamiento químico para cada carbono.

La resonancia de los carbonos del etano, del carbono secundario del propano, del carbono terciario del isobutano y del carbono cuaternario del neopentano sirven como referencia para los carbonos primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios respectivamente.

Valores base: carbono primario: 5,9 ppm

carbono secundario: 16,1 ppm

carbono terciario: 25,2 ppm

carbono cuaternario: 27,9 ppm

A estos valores de referencia se adicionan incrementos que están asociados con diferentes interacciones presentes en la molécula y que se representan por los distintos parámetros que se definen a continuación.

Parámetros utilizados para hidrocarburos

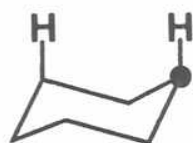
CH: interacciones sesgadas carbono-hidrógeno. Expresa las interacciones entre hidrógenos 1,3-diparalelos. Se las nombró así porque, en la práctica, esas interacciones se presentan cuando existe una relación sesgada entre el hidrógeno unido al carbono analizado y el carbono β a éste, que a su vez está unido al segundo hidrógeno en cuestión.

CC: interacciones sesgadas carbono-carbono. Indica las interacciones entre hidrógenos unidos a un carbono α y a un carbono β al carbono estudiado y que se encuentran enlazados en una secuencia como la siguiente: $H(\alpha)-C_1(\alpha)-C-C_2(\alpha)-C_2(\beta)-H(\beta)$. El requerimiento necesario para ubicar fácilmente esta interacción es que exista una relación sesgada carbono-carbono entre los carbonos $C_1(\alpha)$ y $C_2(\beta)$ y que dichos carbonos no pertenezcan al mismo ciclo.

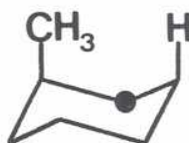
δ : expresa la interacción que se produce cuando existe una relación 1,3-diparalela entre el carbono estudiado y otro carbono de la molécula, con la condición de que ambos no pertenezcan al mismo ciclo.

Las siguientes figuras contribuyen a aclarar las interacciones mencionadas, indicándose con un punto el carbono afectado. El cálculo teórico de su desplaza-

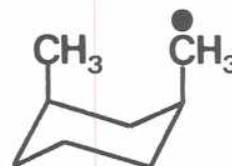
miento químico surge de incrementar su valor base en la magnitud que se indica en cada caso.



CH = 4,55 ppm



CC = 1,85 ppm



δ = 2,56 ppm

Parámetros utilizados para moléculas con grupos hidroxilo.

Los parámetros debidos a la presencia de un grupo hidroxilo en la molécula sólo se aplican en el caso de alcoholes secundarios. El valor base para el cálculo teórico del desplazamiento químico del carbono unido al hidroxilo es:

T = 66,99 ppm , reemplazando éste al valor base antes mencionado.

OC : interacciones sesgadas oxígeno-carbono. Representa la interacción que aparece cuando existe una relación sesgada entre el oxígeno y un carbono en β al mismo.

HO Y CO : interacciones sesgadas hidrógeno-oxígeno y carbono-oxígeno. Indica las interacciones que surgen como consecuencia de una relación sesgada entre un hidrógeno o un carbono unidos al carbono estudiado y el oxígeno unido a un carbono vecino.

γ (OH) : señala las interacciones que se presentan cuando hay una relación γ sesgada o γ anti entre el carbono en estudio y el oxígeno.

δ (OH) : corresponde a las interacciones que se deben a una relación δ *sin*-diaxial

entre el carbono analizado y el oxígeno.

Las figuras siguientes muestran los distintos casos junto con el valor correspondiente a cada interacción. Las líneas punteadas indican interacciones segadas.



$T = 60,99 \text{ ppm}$



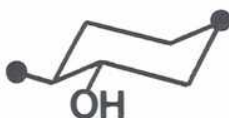
$OC = 1,97 \text{ ppm}$



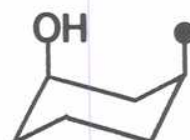
$HO = 4,41 \text{ ppm}$



$CO = 2,28 \text{ ppm}$



$\gamma(OH) = -1,28 \text{ ppm}$



$\delta(OH) = 2,86 \text{ ppm}$

Parámetros utilizados para moléculas con grupos carbonilo.

Las figuras representan los parámetros a utilizar por la presencia de grupos carbonilo en la molécula. El parámetro $C = 212,19 \text{ ppm}$ es el valor base que se emplea para la determinación del desplazamiento químico del carbono unido directamente al oxígeno. Las cantidades indicadas son los incrementos de los valores teóricos de los desplazamientos de los carbonos señalados con un punto.



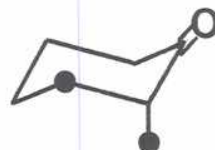
$$C = 212,19 \text{ ppm}$$



$$\beta(CO) = 14,70 \text{ ppm}$$



$$\gamma_{syn} = -0,22 \text{ ppm}$$



$$\gamma_{anti} = 5,15 \text{ ppm}$$

Parámetros utilizados para moléculas con dobles enlaces.

Los parámetros T y Q son los valores base para el cálculo teórico del desplazamiento químico de los carbonos olefínicos terciarios y cuaternarios respectivamente. El parámetro R es una corrección que se suma al valor base T o Q si el segundo de los carbonos sp^2 es cuaternario. Los parámetros $\beta(\text{olef.})$ y $\gamma(\text{olef.})$ se emplean para la determinación de los valores correspondientes a los carbonos alílicos y homoalílicos respectivamente y no se usan si esos carbonos son sp^3 cuaternarios o sp^2 .



$$T = 125,99 \text{ ppm}$$



$$Q = 137,80 \text{ ppm}$$



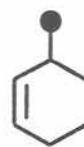
$$R = -8,47 \text{ ppm}$$



$\beta(\text{olef.}) = 3,86 \text{ ppm}$



$\gamma(\text{olef. } \textit{syn}) = 1,41 \text{ ppm}$



$\gamma(\text{olef. } \textit{anti}) = 5,23 \text{ ppm}$

**DESCRIPCION Y DISCUSION
DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
EN LOS ESTUDIOS BIOSINTETICOS**

Tabla 1. Precursores administrados a plantas de *D. purpurea*

COMPUESTO ADMINISTRADO	NUMERO DE PLANTAS USADAS	ACTIVIDAD TOTAL ADMINISTRADA	MASA TOTAL ADMINISTRADA
21- ¹⁴ C 3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona	3	8,19x10 ⁵ dpm	81 µg
21- ¹⁴ C 3β-hidroxi-5β-pregn-8(14)-en-20-ona	3	26,00x10 ⁵ dpm	102 µg

RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS DE ADMINISTRACION DE

|21-¹⁴C| 3β-HIDROXI-5β-PREGNAN-20-ONA

Tabla 2. Aislamiento de los cardenólidos.

DURACION DE LA EXPERIENCIA	ACTIVIDAD RECUPERADA POR LAVADO DE LAS HOJAS (dpm)	EXTRACTO ETereo (dpm)	AISLAMIENTO POR CCD (dpm)	
			DIGITOXINA	DIGOXINA + GITOXINA
a) 4 días	2,03x10 ⁵	5,49x10 ⁴	2075	818
b) 9 días	1,89x10 ⁵	5,22x10 ⁴	1187	524
c) 14 días	2,25x10 ⁵	6,92x10 ⁴	1381	640

Tabla 3. Recristalización de digitoxina hasta actividad constante.

DURACION DE LA EXPERIENCIA	MASA TOTAL DE DIGITOXINA*	ACTIVIDAD TOTAL	ACTIVIDAD ESPECIFICA CALCULADA*	ACTIVIDAD ESPECIFICA		
				1° REC.	2° REC.	3° REC.
días	mg	dpm	dpm/mg	dpm/mg		
a) 4	54	1250	23,2	18,2	20,5	20,7
b) 9	60	880	14,7	12,0	13,6	13,5
c) 14	54	700	12,9	10,9	11,3	11,4

* MASA TOTAL DE DIGITOXINA: masa de digitoxina aislada de la planta +
masa de digitoxina agregada (ver página 109).

* ACTIVIDAD ESPECIFICA CALCULADA: la actividad específica se calculó te-
niendo en cuenta la masa total de digitoxina
(ver página 109).

RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS DE ADMINISTRACION DE

$|21-^{14}\text{C}|$ 3 β -HIDROXI-5 β -PREGN-8(14)-EN-20-ONA

Tabla 4. Aislamiento de los cardenólidos.

DURACION DE LA EXPERIENCIA	ACTIVIDAD RECUPERADA POR LAVADO DE LAS HOJAS (dpm)	EXTRACTO ETEREO (dpm)	AISLAMIENTO POR CCD (dpm)	
			DIGITOXINA	DIGOXINA + GITOXINA
d) 4 días	7,76x10 ⁵	8,20x10 ⁴	780	412
e) 9 días	7,40x10 ⁵	9,64x10 ⁴	683	459
f) 14 días	6,79x10 ⁵	12,07x10 ⁴	468	241

Tabla 5. Separación de digoxina y gitoxina.

DURACION DE LA EXPERIENCIA	DIGOXINA AISLADA POR CCD	GITOXINA AISLADA POR CCD
días	dpm	dpm
d) 4	169	188
e) 9	185	211
f) 14	107	98

Tabla 6. Recristalización de digitoxina hasta actividad constante.

DURACION DE LA EXPERIENCIA	MASA TOTAL DE DIGITOXINA*	ACTIVIDAD TOTAL	ACTIVIDAD ESPECIFICA CALCULADA*	ACTIVIDAD ESPECIFICA	
				1° REC.	2° REC.
días	mg	dpm	dpm/mg	dpm/mg	
d) 4	35	686	19,6	13,7	0
e) 9	33	601	18,2	12,9	0
f) 14	34	412	12,1	8,1	0

- * MASA TOTAL DE DIGITOXINA: masa de digitoxina aislada de la planta + masa de digitoxina agregada (ver página 109).
- ACTIVIDAD ESPECIFICA CALCULADA: la actividad específica se calculó teniendo en cuenta la masa total de digitoxina (ver página 109).

Tabla 7. Hidrólisis de la digitoxina proveniente de la experiencia d).

EXTRACCION DE LA DIGITOXIGENINA		ACTIVIDAD ESPECIFICA CALCULADA*	ACTIVIDAD ESPECIFICA 1° REC.
EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ORGANICO		
38 dpm	465 dpm	36,6 dpm/mg	0 dpm/mg

Tabla 8. Recristalización de digoxina y gitoxina hasta actividad constante.

DURACION DE LA EXPERIENCIA	MASA TOTAL		ACTIVIDAD TOTAL		ACTIVIDAD ESPECIFICA CALCULADA •		ACTIVIDAD ESPECIFICA 1º REC.	
	DIGOXINA*	GITOXINA*	DIGOXINA	GITOXINA	DIGOXINA	GITOXINA	DIGOXINA	GITOXINA
días	mg		dpm		dpm/mg		dpm/mg	
d) 4	25	25	152	169	6,1	6,8	0	0
e) 9	30	25	166	190	5,5	7,6	0	0
f) 14	20	18	96	88	4,8	4,9	0	0

* MASA TOTAL DE DIGOXINA Y GITOXINA: masa de digoxina o gitoxina aislada de la planta + masa de digoxina o gitoxina agregada (ver página 109).

• ACTIVIDAD ESPECIFICA CALCULADA: la actividad específica se calculó teniendo en cuenta la masa total de digoxina o gitoxina (ver página 109).

DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

De acuerdo a los datos de Evans y Cowley⁸⁷ la concentración de cardenólidos en plantas de *D. purpurea* presenta un incremento de 14,1 a 115,6 µg/g de planta fresca, durante los primeros siete meses de crecimiento. Estos mismos autores indicaron que el aumento es más pronunciado entre el tercer y el cuarto mes de desarrollo. Es por este motivo que se eligió trabajar con plantas comprendidas en ese estadio para las que la concentración de cardenólidos varía, en esa etapa, de 0,04 a 0,1 mg/g de planta fresca. Las plantas preparadas para la experiencia tenían un peso promedio de 5 g.

Por otra parte, se conoce que la época de mayor actividad metabólica de las plantas es la temporada estival. En nuestro caso, las experiencias fueron realizadas en el mes de mayo. Si bien no es el período óptimo de producción de los glicósidos, los datos obtenidos de la inoculación de $[21-^{14}\text{C}]$ 3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona (19) permiten deducir que este factor no impidió la correcta incorporación del compuesto utilizado como patrón para los ensayos, en los lapsos de tiempo indicados.

Aunque se conocían las condiciones de germinación de las semillas y de crecimiento de las plantas, se presentaron diferentes inconvenientes. Uno de ellos derivó del bajo porcentaje de germinación de las semillas, pese a las distintas condiciones ensayadas para la misma y pudo deberse a que éstas tenían un tiempo relativamente largo de almacenamiento. Por otro lado, no resultó simple mantener todas las plantas en estado óptimo de desarrollo. Muchas de ellas se marchitaban

a los dos o tres meses de crecimiento, probablemente a causa de que el clima en el que se estaban desarrollando no era el característico de las zonas frías donde se las encuentra naturalmente.

Los factores comentados condicionaron el trabajo con un bajo número de plantas.

Dado que la cantidad de glicósidos aislada de cada experiencia era escasa como para proceder a recrystalizar, se diluyó con los correspondientes cardenólidos fríos y se efectuaron las recrystalizaciones hasta actividad constante con un valor de actividad específica calculado, diferente del verdadero. Empleando este dato se pudo determinar la posible participación de los precursores administrados en el camino metabólico de los glicósidos cardiotónicos. Por lo tanto, de acuerdo con lo que se acaba de exponer, los valores de actividad específica calculada que figuran en las tablas 3, 6, 7 y 8 se establecieron usando la masa agregada ya que la proveniente de la planta es de un orden muy inferior.

Tal como se observa en la tabla 3, se pudo llegar a actividad constante por recrystalización de la digitoxina proveniente de plantas inoculadas con $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (19). Este hecho era previsible ya que Tschesche y colaboradores²⁴ habían demostrado su participación como precursor.

Como se ha indicado en la tabla 4, el extracto etéreo proveniente de las plantas inoculadas con $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregn-8(14)-en-20-ona (38) presentaba radiactividad. Las zonas cromatográficas correspondientes a digitoxina, digoxina y gitoxina separadas por ccd, con el mismo método que en el caso anterior,

también tenían actividad.

De la misma forma en que se había procedido con el estándar, en este caso, se recrystalizaron los glicósidos tratando de obtener un valor de actividad específica constante. Pero, tal como se muestra en las tablas 6 y 8, los valores descendieron rápidamente a cero, lo que demuestra la pérdida total de actividad de los cardenólidos extraídos a los 4, 9 y 14 días.

Para confirmar este dato negativo, se hidrolizó la digitoxina, para determinar la radiactividad presente en la porción esteroideal. Los datos correspondientes, luego de la recrystalización de la aglicona, se encuentran en la tabla 7 y demuestran una pérdida rápida de actividad.

La coincidencia de ambos resultados permitió concluir que la radiactividad de la fracción separada por ccd se encontraba asociada con otro producto presente en el extracto y que no correspondía a los glicósidos en estudio.

En consecuencia se puede concluir que los glicósidos cardenólidos digitoxina, digoxina y gitoxina aislados de las plantas inoculadas con el precursor propuesto (38) no resultaron activos. Ello significa un acuerdo con los resultados obtenidos por Caspi y colaboradores⁴¹ que sostenían que un doble enlace en las posiciones 7, 8(9) u 8(14) no eran la característica estructural precursora de la introducción de un hidroxilo 14 β en la molécula. Además indica una contraposición con los resultados de Tschesche⁴² que obtuvo una incorporación positiva con un precursor que tenía un doble enlace en la posición 8(14).

Caspi administró a plantas de *D. lanata* una mezcla de $|8-^3\text{H}|$ colesterol y

$|4-^{14}\text{C}|$ colesterol cuya relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ era 12,1. Al cabo de la experiencia procesó las plantas y aisló digitoxigenina y digoxigenina que fueron diluídas con compuestos auténticos y recrystalizadas hasta actividad específica constante de ^{14}C y relación constante de $^3\text{H}/^{14}\text{C}$. Los resultados demostraron que la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ del colesterol de partida (12,5) se mantenía perfectamente luego de tres recrystalizaciones de la digitoxigenina obtenida (12,5) y de una recrystalización de la digoxigenina (13,1). Esto los llevó a concluir que la conversión biosintética de $|8-^3\text{H}|$ colesterol en digitoxigenina y digoxigenina no involucraba la pérdida del tritio de la posición 8. Por lo tanto, la introducción del hidroxilo 14β de los cardenólidos procedía sin pérdida del hidrógeno de carbono 8 de colesterol, lo cual excluía la posibilidad de participación de dobles enlaces centrados en esa posición.

En el trabajo de Tschesche⁴² los resultados no aportan datos tan exactos como en el anterior. Los autores afectan tres ensayos:

- 1) coinyección de $|7-^3\text{H}|$ 5β -pregn-8(14)-en-3,20-diona y $|4-^{14}\text{C}|$ progesterona.
- 2) coinyección de $|7\alpha-^3\text{H}|$ pregnenolona y $|4-^{14}\text{C}|$ pregnenolona
- 3) coinyección de $|6-^3\text{H}|$ Δ^7 -progesterona y $|4-^{14}\text{C}|$ progesterona.

Los autores informaron una pérdida del 50% de actividad en tritio en los glicósidos aislados luego de las experiencias 1 y 2. Es evidente que no existe en este caso una justificación rigurosa para esta pérdida, ya que ellos mismos plantean que, si bien no pueden explicarla, podría deberse a una diferente incorporación de los precursores o a errores en el método de administración o de

trabajo. Lo que resulta cierto es que Tschesche obtuvo una cierta incorporación en contraposición al resultado del presente trabajo, donde la incorporación es nula.

No parece factible que la diferencia en la estructura esteroidal del anillo A entre el precursor utilizado por Tschesche (33) y el compuesto administrado en este caso (38) justifique los resultados. Si ello fuera así, cabría pensar que el precursor ensayado por Tschesche participa de un camino biosintético alternativo. Dicho precursor, se encontraría pasos más atrás que el empleado en las presentes pruebas, dado que contiene el grupo cetónico en carbono 3 que debería ser reducido a un 3 β -hidroxi derivado. La participación en dicho camino alternativo, que hasta el momento se desconoce, permitiría explicar en parte la pérdida de tritio que tuvieron los autores en la experiencia 1. No ocurre lo mismo con la pérdida de tritio de la experiencia 2, dado que pregnenolona se encuentra en el camino principal. Este último dato apoyaría factores o errores intervinientes de otro tipo.

Tal como se ha planteado, estos caminos alternativos son factibles. Por ejemplo, en el caso de la biosíntesis de gitoxina en plantas de *Digitalis*, hay dos alternativas posibles, en una de ellas procede directamente a partir de un pregnano y en la otra a partir de digitoxina.

Por otro lado, llama la atención que en las síntesis de los compuestos 33 y 37 descritas por Tschesche^{42,43} se utilice como método para la isomerización del doble enlace de la posición 7 a la 8(14) una hidrogenación catalítica con

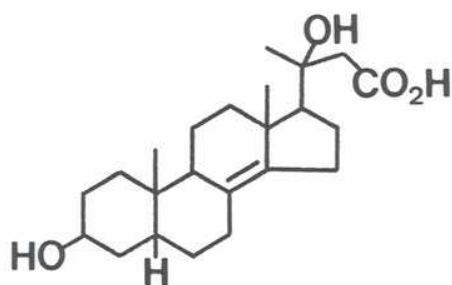
paladio en ácido acético, ya que anteriormente había sido analizado por Barton⁶⁵ que, en la serie de los derivados 5 β -esteroidales, este tratamiento conducía a un muy bajo porcentaje de isomerización. Los autores describen un 83,5% de rendimiento para el mismo. Estas son las condiciones que se intentaron en el presente trabajo para la isomerización del Δ^7 derivado (71) al $\Delta^{8(14)}$ (72) y, tal como se aclaró anteriormente, no se pudo producir la reacción, incluso variando condiciones de solvente y catalizador.

En el trabajo efectuado por Maier⁸⁸, intentando esclarecer el proceso de construcción del anillo lactónico en la biosíntesis de los glicósidos cardiotónicos en estas mismas plantas, se demostró la participación de intermediarios con cadena lateral del tipo β -hidroxiácido (*n*) y de ácido α,β -no saturado (*o*) en un camino biosintético alternativo.



Es decir que se planteó una ruta alternativa de ácidos norcolánicos frente a la de los pregnanos demostrada por diferentes autores y diagramada en el esquema 7, para la transformación *in vivo* de pregnenolona en cardenólidos.

En función de estos resultados es que no se descarta la posibilidad de inclusión, en esa ruta alternativa, de un intermediario con un doble enlace 8(14) y con una cadena lateral ya preparada para ciclar (compuesto 101).

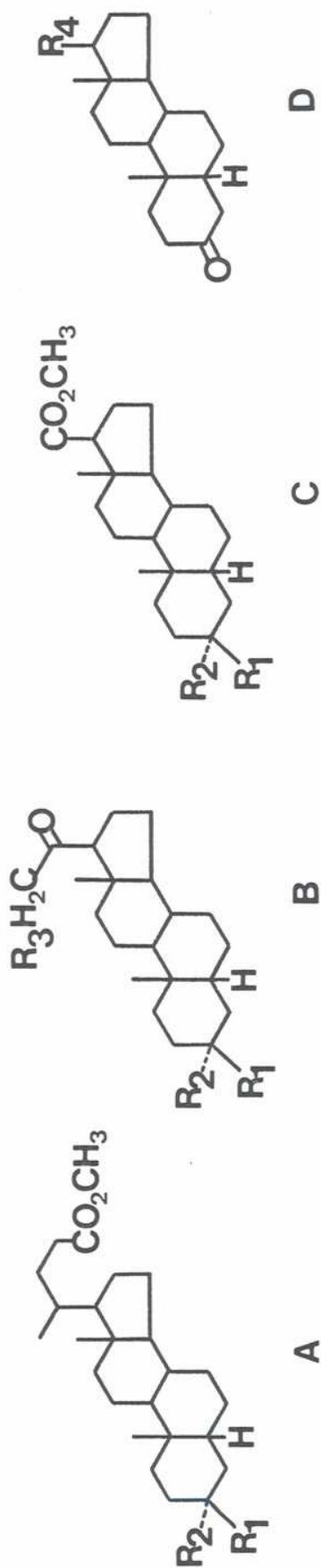


101

La síntesis de un compuesto de este tipo, cuyo posible papel en esa ruta alternativa es de interés estudiar, es factible por reacción de Reformatsky con bromoacetato de etilo sobre un 20-ceto pregnano convenientemente sustituido. El camino desarrollado en este trabajo para la degradación de la cadena lateral del ácido biliar se realizó, por este motivo, obteniendo en los pasos intermedios un derivado con una cadena lateral preparada para esta reacción (compuesto 47).

**DESCRIPCION Y DISCUSION
DE LOS RESULTADOS
OBTENIDOS EN RMN-¹³C**

Figura 2: Compuestos cuyos datos de desplazamiento químico de RMN-¹³C se encuentran detallados en la tabla 9.



Nº	ESTRUCTURA	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
102	A	OH	H		3β-hidroxi-5β-colan-24-oato de metilo
61	A	OAc	H		3β-acetoxi-5β-colan-24-oato de metilo
68	A	OCOH	H		3β-formiloxi-5β-colan-24-oato de metilo
58	A	H	OH		3α-hidroxi-5β-colan-24-oato de metilo
60	A	H	OAc		3α-acetoxi-5β-colan-24-oato de metilo
67	A	H	OTs		3α-tosiloxi-5β-colan-24-oato de metilo
110	A	H	OCOH		3α-formiloxi-5β-colan-24-oato de metilo
59	D			$\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{CH}_3$	3-oxo-5β-colan-24-oato de metilo

N°	ESTRUCTURA	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
19	B	OH	H	H	3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona
100	B	OAc	H	H	3β-acetoxi-5β-pregnan-20-ona
103	B	H	OH	H	3α-hidroxi-5β-pregnan-20-ona
92	B	H	OAc	H	3α-acetoxi-5β-pregnan-20-ona
106	D			COCH ₃	5β-pregnan-3,20-diona
104	B	OH	H	OH	3β,21-dihidroxi-5β-pregnan-20-ona
108	B	OAc	H	OAc	3β,21-diacetoxi-5β-pregnan-20-ona
94	B	H	OH	OH	3α,21-dihidroxi-5β-pregnan-20-ona
93	B	H	OAc	OAc	3α,21-diacetoxi-5β-pregnan-20-ona
105	C	OH	H		3β-hidroxi-5β-androstan-17β-carboxilato de metilo
109	C	OAc	H		3β-acetoxi-5β-androstan-17β-carboxilato de metilo
97	C	OCOH	H		3β-formiloxi-5β-androstan-17β-carboxilato de metilo
95	C	H	OH		3α-hidroxi-5β-androstan-17β-carboxilato de metilo
96	C	H	OTs		3α-tosiloxi-5β-androstan-17β-carboxilato de metilo
107	D			COCH ₃	3-oxo-5β-androstan-17β-carboxilato de metilo

Tabla 9:

CARBONO	COMPUESTO					
	102	61	68	58	60	67
1	29,97	(30,69)	30,59	35,31	34,98	35,20
2	27,91	25,06	25,05	30,45	26,29	26,13
3	67,06	70,72	70,87	71,58	74,29	82,87
4	33,60	(30,78)	30,59	36,36	32,19	33,01
5	36,60	37,38	37,26	42,06	41,82	41,96
6	26,29	26,18	26,14	27,18	26,98	27,46
7	26,69	26,55	26,46	26,39	26,56	26,76
8	35,70	35,72	35,68	35,81	35,72	35,58
9	40,28	40,22	40,17	40,39	40,36	40,25
10	35,13	34,89	34,84	34,52	34,51	34,89
11	21,13	21,14	21,11	20,79	21,39	20,71
12	39,82	39,96	40,00	40,13	40,09	39,94
13	42,78	42,79	42,74	42,66	42,68	42,58
14	56,63	56,55	56,54	56,40	56,39	56,27
15	24,18	24,20	24,15	24,16	24,13	24,08
16	28,17	28,16	28,14	28,12	28,09	28,05
17	56,05	56,02	56,02	55,90	55,89	55,80
18	12,09	12,09	12,08	12,00	12,01	11,97
19	23,87	23,84	23,77	23,35	23,29	23,03
20	35,35	35,36	35,31	35,31	35,24	35,58
21	18,28	18,30	18,29	18,24	18,23	18,19
22	31,08	31,09	31,04	30,99	(30,98)	(30,89)
23	31,08	31,09	31,04	30,99	(30,72)	(30,88)
24	174,38	174,41	174,31	174,50	174,07	174,19
CH ₃ C <u>OO</u>		170,40			170,43	
<u>CH</u> ₃ C <u>OO</u>		21,46			20,81	
COO <u>CH</u> ₃	51,31	51,34	51,28	51,35	51,34	51,25
H <u>C</u> OO			160,44			
H ₃ C-C ₆ H ₄ -SO ₂ -						127,30 129,49
						134,62 144,00
H ₃ C-C ₆ H ₄ -SO ₂ -						21,51

Tabla 9.

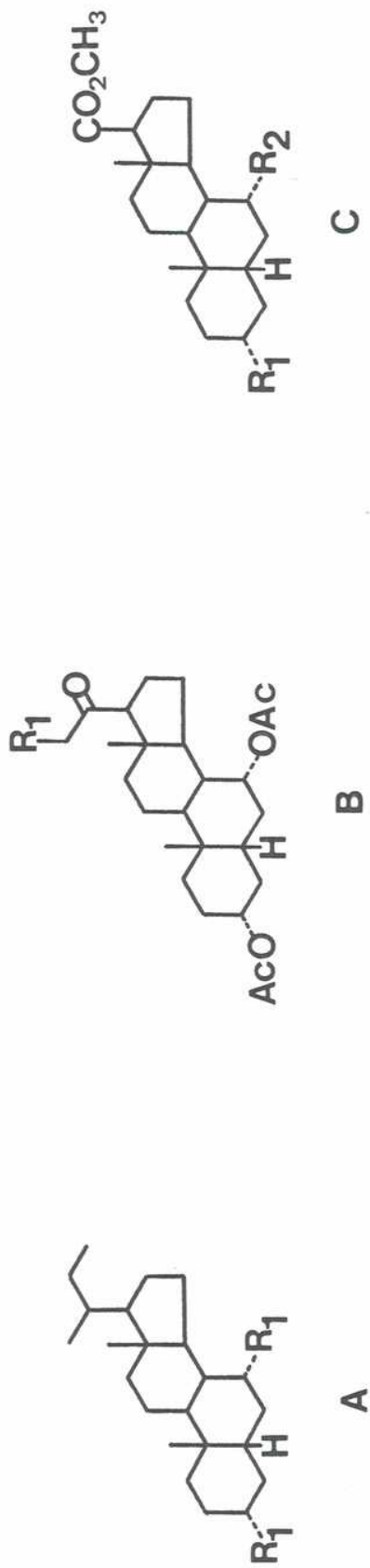
CARBONO	COMPUESTO					
	110	59	19	100	103	92
1	34,36	36,89	30,00	(30,42)	35,72	35,15
2	26,19	36,81	27,92	24,83	30,83	26,30
3	73,76	212,12	66,86	70,31	71,62	74,38
4	32,06	42,06	33,46	(30,58)	36,73	32,36
5	41,72	44,06	36,36	37,11	42,39	42,15
6	26,85	25,61	26,00	25,99	27,48	27,09
7	26,49	26,47	26,32	26,26	26,72	26,76
8	35,62	35,11	35,70	35,48	35,96	35,50
9	40,27	40,48	39,82	39,70	40,72	40,84
10	34,81	34,64	35,70	34,73	34,86	34,72
11	20,71	21,04	21,00	20,94	21,18	21,50
12	39,95	39,85	39,29	39,06	39,52	39,45
13	42,51	42,54	44,36	44,11	44,38	44,06
14	56,26	56,18	56,78	56,55	56,88	56,52
15	24,04	23,99	24,52	24,25	24,73	24,49
16	27,98	27,95	22,89	22,73	22,86	23,40
17	55,81	55,76	63,99	63,61	64,05	64,20
18	11,87	11,90	13,52	13,28	13,36	13,52
19	23,14	22,46	23,87	23,63	23,43	23,45
20	35,14	35,32	209,62	208,80	209,72	209,70
21	18,09	18,10	31,49	31,31	31,55	31,62
22	(30,76)	30,75				
23	(30,69)	30,75				
24	173,72	173,94				
CH ₃ C <u>O</u> O				170,14		170,39
<u>C</u> H ₃ C <u>O</u> O				21,30		20,59
C <u>O</u> O <u>C</u> H ₃	51,01	51,12				
H <u>C</u> <u>O</u> O	160,01					

CARBONO	COMPUESTO					
	106	104	108	94	93	105
1	37,02	29,92	(30,55)	35,27	35,02	30,04
2	36,86	27,78	24,97	30,44	26,34	27,92
3	212,35	66,91	70,48	71,55	74,11	67,03
4	42,16	33,43	(30,71)	36,28	32,22	33,62
5	44,08	36,43	37,19	41,91	41,75	36,58
6	25,66	26,31	26,10	27,01	26,90	26,37
7	26,46	26,53	26,35	26,38	26,63	26,62
8	35,43	35,64	35,64	35,80	35,78	35,88
9	40,59	39,72	39,82	40,35	40,35	39,90
10	34,83	35,17	34,89	34,56	34,60	35,26
11	21,11	21,02	20,43	20,70	21,40	20,99
12	38,98	39,00	38,91	38,90	38,85	38,69
13	44,08	45,08	44,96	44,99	44,91	44,32
14	56,44	56,88	56,86	56,74	56,80	56,13
15	24,32	24,55	24,49	24,50	24,51	24,52
16	22,84	23,02	22,88	22,99	22,89	23,86
17	63,55	59,40	59,38	59,33	59,33	55,44
18	13,35	13,56	13,29	13,50	13,26	13,56
19	22,53	23,81	23,74	23,26	23,26	23,86
20	208,79	210,21	203,49	210,04	203,39	174,35
21	31,39	69,30	69,04	69,30	69,07	
CH ₃ C <u>O</u> O			169,99		169,91	
			170,43		170,23	
<u>C</u> H ₃ C <u>O</u> O			21,06		20,44	
			21,13		20,82	
COO <u>C</u> H ₃						51,07
H <u>C</u> OO						

Tabla 9.

CARBONO	COMPUESTO				
	109	97	95	96	107
1	(30,50)	30,56	35,47	35,09	37,09
2	24,92	24,98	30,62	26,29	36,97
3	70,61	70,74	71,76	83,09	212,61
4	(30,70)	30,56	36,54	33,15	42,23
5	37,20	37,15	42,15	42,10	44,15
6	26,13	26,13	27,19	27,61	25,81
7	26,34	26,29	26,55	26,82	26,52
8	35,73	35,73	36,09	35,89	35,66
9	39,85	39,94	40,62	40,46	40,80
10	34,83	34,88	34,72	34,46	34,89
11	20,86	20,87	20,76	20,69	21,01
12	38,30	38,52	38,67	38,51	38,45
13	44,27	44,20	44,31	44,20	44,15
14	56,00	55,90	56,04	55,85	55,79
15	24,40	24,44	24,60	24,51	24,44
16	23,75	23,69	23,83	23,77	23,68
17	55,19	55,27	55,43	55,85	55,24
18	13,29	13,49	13,60	13,56	13,51
19	23,42	23,69	23,39	23,13	22,58
20	174,30	174,24	174,37	174,34	174,12
$\text{CH}_3\text{C}\text{--}\text{OO}$	170,54				
$\text{C}\text{--}\text{H}_3\text{C}\text{OO}$	21,39				
$\text{COOC}\text{--}\text{H}_3$	51,06	51,10	51,10	51,16	51,13
$\text{HC}\text{--}\text{OO}$		160,50			
$\text{H}_3\text{C}\text{--}\text{C}_6\text{H}_4\text{--}\text{SO}_2\text{--}$				126,92	130,19
				134,67	144,31
$\text{H}_3\text{C}\text{--}\text{C}_6\text{H}_4\text{--}\text{SO}_2\text{--}$				21,84	

Figura 3: Compuestos cuyos datos de desplazamiento químico de RMN-¹³C se encuentran detallados en la tabla 10.



Nº	ESTRUCTURA	R ₁	R ₂	Δ
49	A	OAc		22
50	A	OH		20(22)
51	A	OAc		20(22)
47	B	H		
52	B	OAc		
57	C	OH	OH	
78	C	OSuc	OH	

diacetato de 24-nor-5β-col-22-eno-3α,7α-diol

24-nor-5β-col-20(22)-eno-3α,7α-diol

diacetato de 24-nor-5β-col-20(22)-eno-3α,7α-diol

3α,7α-diacetoxi-5β-pregnan-20-ona

3α,7α,21-triacetoxi-5β-pregnan-20-ona

3α,7α-dihidroxi-5β-androstan-17β-carboxilato de metilo

7α-hidroxi-3α-metilsuccinoxi-5β-androstan-17β-carboxilato de metilo

N°	ESTRUCTURA	R ₁	R ₂	Δ	
80	C	OSuc	H	8(14)	3α-metilsuccinoxi-5β-androst-8(14)-en-17β-carboxilato de metilo
81	C	OH	H	8(14)	3α-hidroxi-5β-androst-8(14)-en-17β-carboxilato de metilo
82	C	OTs	H	8(14)	3α-tosiloxi-5β-androst-8(14)-en-17β-carboxilato de metilo
83	C	OCOH	H	8(14)	3β-formiloxi-5β-androst-8(14)-en-17β-carboxilato de metilo

Tabla 10.

CARBONO	COMPUESTO					
	49	50	51	47	52	57
1	(34,92)	(35,39)	(34,98)	(34,81)	(34,81)	(35,41)
2	26,81	30,66	26,82	26,78	26,74	30,71
3	74,11	71,94	74,08	73,94	73,94	71,81
4	(34,65)	39,77	(34,68)	(34,60)	(34,58)	39,63
5	41,08	41,56	41,06	40,87	40,81	41,53
6	31,34	34,59	31,33	31,24	31,19	34,93
7	71,18	68,52	71,15	70,99	71,00	68,33
8	37,92	39,87	37,97	37,86	37,86	39,84
9	34,13	33,13	34,37	34,09	34,03	32,99
10	(34,82)	(35,13)	(34,68)	(34,90)	(34,81)	(35,14)
11	20,66	20,59	20,67	20,65	21,39	20,50
12	39,40	38,55	38,42	38,53	38,20	38,15
13	42,62	43,73	43,74	44,10	44,70	44,16
14	50,41	49,93	50,68	50,61	50,77	50,00
15	23,59	23,70	23,58	23,78	23,85	(23,97)
16	28,28	24,75	24,70	22,61	22,56	(23,77)
17	55,47	58,89	58,92	63,46	59,09	55,27
18	11,90	12,79	12,72	13,03	12,88	12,23
19	22,70	22,80	22,71	22,89	22,83	22,71
20	40,98	135,07	134,84	208,80	203,29	174,24
21	20,11	17,59	17,51	31,41	170,00	
22	144,82	119,02	119,14			
23	111,60	13,47	13,45			
CH ₃ CO ₂ -	170,16		170,03	169,94	170,00	
	170,37		170,24	170,26	170,33	
CH ₃ CO ₂ -	21,50		21,41	21,48	20,43	
			21,51		20,60	
-CO ₂ CH ₃						51,06

Tabla 10.

CARBONO	COMPUESTO				
	78	80	81	82	
1	(35,10)	(35,89)	(36,34)	(35,73)	
2	26,67	26,92	30,91	26,91	
3	74,64	74,36	71,40	82,76	
4	(35,02)	31,77	(36,00)	32,71	
5	41,26	41,95	42,21	42,08	
6	34,70	27,10	27,39	27,85	
7	68,20	24,76	24,94	24,61	
8	39,57	128,21	128,57	127,73	
9	32,95	36,20	36,00	36,00	
10	(35,25)	(36,33)	(36,34)	(36,09)	
11	20,49	19,31	19,36	19,23	
12	38,04	34,22	34,63	34,18	
13	44,12	43,24	43,32	43,16	
14	49,95	138,85	138,62	139,16	
15	(23,95)	25,59	25,61	25,55	
16	(23,75)	23,75	23,84	23,72	
17	55,20	56,26	56,29	56,17	
18	13,22	19,74	19,77	19,69	
19	22,64	23,48	23,62	23,25	
20	174,15	173,83	174,06	173,78	
-O ₂ C(CH ₂) ₂ CO ₂ CH ₃	171,47	172,46	171,47	172,53	
-O ₂ C(CH ₂) ₂ CO ₂ CH ₃	29,05	29,55	28,99	29,48	
-O ₂ C(CH ₂) ₂ CO ₂ CH ₃	51,61	51,65			
-CO ₂ CH ₃	51,03	51,09		51,09	
CH ₃ -C ₆ H ₄ -SO ₂ -				21,56	
CH ₃ -C ₆ H ₄ -SO ₂ -				127,34	129,59
				134,51	144,25

Tabla 10.

CARBONO	COMPUESTO
	83
1	(30,31)
2	25,66
3	70,72
4	(29,98)
5	37,36
6	26,59
7	24,57
8	128,21
9	35,95
10	36,59
11	19,65
12	35,66
13	43,32
14	138,99
15	25,66
16	24,04
17	56,34
18	19,76
19	23,83
20	173,96
-CO ₂ <u>C</u> H ₃	51,18
H <u>C</u> OO-	160,56

ANALISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS PARA DERIVADOS 5 β -ESTEROIDALES

SUSTITUIDOS EN CARBONO 3 Y CON DIFERENTES CADENAS LATERALES (TABLA 9).

Como era previsible, un cambio funcional o configuracional en carbono 3 mantiene prácticamente invariable el desplazamiento químico de los carbonos de los anillos C y D y de la cadena lateral y modifica en el orden de 2 a 6 ppm el de los carbonos 1 a 5.

A - INVERSION DE CONFIGURACION

Se estudió la influencia del cambio de configuración del carbono 3 por comparación de los datos obtenidos para los siguientes pares de compuestos:

- 3 α - y 3 β -hidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (58 y 102)
- 3 α - y 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (103 y 19)
- 3 α - y 3 β ,21-dihidroxi-5 β -pregnan-20-ona (94 y 104)
- 3 α - y 3 β -hidroxi-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (95 y 105).

Los valores de desplazamiento químico y las diferencias entre los valores analizados figuran en la tabla 11.

Se observa que en todos los casos el cambio del isómero 3 α al 3 β produce un corrimiento a campos más altos de los valores de resonancia de los carbonos del anillo A. Las diferencias son de aproximadamente 4,6 ppm para el átomo de carbono unido al oxígeno, 2-3 ppm para los carbonos β (2 y 4) y 5-6 ppm para los carbonos γ (1 y 5). Estos desplazamientos fueron observados también por Engelhard y colaboradores⁸¹ para 3 α y 3 β coprostanos e interpretado en térmi-

Tabla 11. Diferencias en los desplazamientos químicos producidas por un cambio configuracional en el carbono 3.

	58 3 α	102 3 β	58 \rightarrow 102	103 3 α	19 3 β	103 \rightarrow 19
C-1	35,31	29,97	5,34	35,72	30,00	5,72
C-2	30,45	27,91	2,54	30,83	27,92	2,91
C-3	71,58	67,06	4,52	71,62	66,86	4,76
C-4	36,36	33,60	2,76	36,73	33,46	3,27
C-5	42,06	36,60	5,46	42,39	36,36	6,03

	94 3 α	104 3 β	94 \rightarrow 104	95 3 α	105 3 β	95 \rightarrow 105
C-1	35,27	29,92	5,35	35,47	30,04	5,43
C-2	30,44	27,78	2,66	30,62	27,92	2,70
C-3	71,55	66,91	4,64	71,76	67,03	4,73
C-4	36,28	33,43	2,85	36,54	33,62	2,92
C-5	41,91	36,43	5,48	42,15	36,58	5,57

nos de interacciones sesgadas.

Los compuestos con fusión de anillos A/B *cis* pertenecientes a la serie 3 β tienen el sustituyente de carbono 3 con orientación axial, mientras que en la serie 3 α es ecuatorial (figura 4). En esta última, el hidrógeno 3 β presenta interacciones entre hidrógenos 1,3-diaxiales con los hidrógenos 1 β y 5 β .

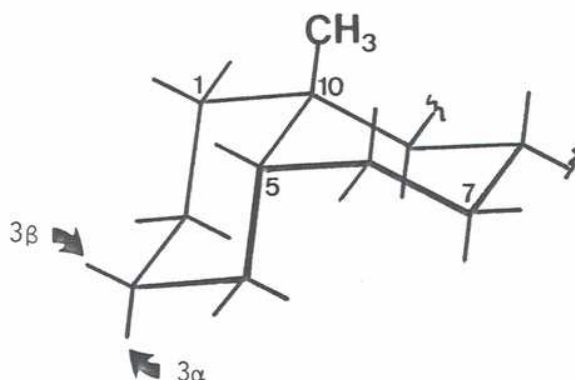


Figura 4

Dichas interacciones son las más importantes pues producen un desplazamiento químico a campos más bajos del orden de 4,5 ppm. Las mismas desaparecen en el isómero β para dar lugar, en este caso, a dos interacciones sesgadas OC (C1-C2-C3-03 β y C5-C4-C3-03 β) que tienen también un efecto desprotector pero de menor valor absoluto ($\approx 1,9$ ppm). Por esta razón un cambio configuracional del tipo $3\alpha \rightarrow 3\beta$ produce como efecto neto un desplazamiento de la señal del carbono 3 a campos más altos.

El desplazamiento a campos más altos también se observa para los carbonos γ (1 y 5) como una consecuencia del mismo efecto. Para estos carbonos ocurre un cambio en los parámetros hidroxilados al variar la interacción γ de anti a sesgada, sin embargo la contribución al desplazamiento químico provocada por cualquiera de estas interacciones es del mismo signo y magnitud por lo que el aporte neto resultante es nulo.

Para los carbonos β (2 y 4) el cambio en la configuración del carbono 3 con

duce a la pérdida de una interacción sesgada HO ($\approx 4,41$ ppm) ($H4\alpha-C4-C3-03\alpha$ y $H2\alpha-C2-C3-03\alpha$) y a la aparición de una interacción sesgada CO ($\approx 2,28$ ppm) ($C5-C4-C3-03\beta$ y $C1-C2-C3-03\beta$) lo que trae como consecuencia un desplazamiento de las señales de los carbonos indicados a campos más altos.

La comparación de las interacciones que se modifican al pasar de la sustitución 3α a la 3β permite justificar el efecto pronunciado que afecta los desplazamientos químicos de los carbonos y respecto de aquellos que son vecinos al centro donde se produjo la inversión.

A continuación se resumen los cambios de interacciones y las diferencias de valores en ellos involucradas.

INTERACCIONES PRESENTES EN EL ISOMERO 3α				INTERACCIONES PRESENTES EN EL ISOMERO 3β			DIFERENCIA TEORICA
TIPO	ENLACES INVOLUCRADOS		VALOR	TIPO	ENLACES INVOLUCRADOS	VALOR	
C1	CH	C1-H1 β y C3-H3 β	4,55				4,55
C2	HO	H2 α -C2-C3-03 α	4,41	CO	C1-C2-C3-03 β	2,28	2,13
C4	HO	H4 α -C4-C3-03 α	4,41	CO	C5-C4-C3-03 β	2,28	2,13
C5	CH	C5-H5 β y C3-H3 β	4,55				4,55

En derivados 5α -esteroidales el cambio de configuración en el carbono 3 produce variaciones con el mismo valor absoluto pero de signo contrario^{82,84}

que aquéllas observadas para los carbonos 1 a 5 de los derivados 5 β . Este hecho resulta previsible pues en la serie 5 α los sustituyentes de carbono 3 con orientación α son axiales y los β ecuatoriales.

B - 3-OXO DERIVADOS

La oxidación de la función alcohólica de carbono 3 a cetona produce sólo una pequeña distorsión en la conformación de la molécula y las características más importantes observadas se deben a factores electrónicos y estéricos. Se compararon las cetonas con los alcoholes correspondientes. Los compuestos analizados fueron:

- 5 β -pregnan-3,20-diona (106) con 3 α - y 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (103 y 19)
- 3-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (59) con 3 α - y 3 β -hidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (58 y 102)
- 3-oxo-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (107) con 3 α - y 3 β -hidroxi-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (95 y 105).

En el siguiente cuadro se presentan las diferencias observadas en los valores de desplazamiento químico para los carbonos β y γ respecto del carbonilo , originadas por el cambio en el grupo funcional.

	C1	C2	C4	C5	
106	37,02	36,86	42,16	44,08	
103 → 106	1,30	6,03	5,43	1,69	3 α OH → 3CO
19 → 106	7,02	8,94	8,70	7,72	3 β OH → 3CO
59	36,89	36,81	42,06	44,06	
58 → 59	1,58	6,36	5,70	2,00	3 α OH → 3CO
102 → 59	6,92	8,90	8,46	7,46	3 β OH → 3CO
107	37,09	36,97	42,23	44,15	
95 → 107	1,62	6,35	5,69	2,00	3 α OH → 3CO
105 → 107	7,05	9,05	8,61	7,57	3 β OH → 3CO

El grupo carbonilo induce un desplazamiento sistemático a campos más bajos en las señales de los carbonos β y γ , siendo más importante en aquellas provenientes de la serie 3 β que de la 3 α .

En los derivados 3 α -hidroxilados cada uno de los carbonos β presenta dos interacciones H0 (03-C3-C4-H4 α , 03-C3-C4-H4 β , 03-C3-C2-H2 α y 03-C3-C2-H2 β). En cambio los carbonos β de los derivados 3 β -hidroxilados presentan solamente una interacción H0 (03-C3-C2-H2 β y 03-C3-C4-H4 β) y una interacción CO (03-C3-C2-C1 y 03-C3-C4-C5) de mucha menor importancia en lo que concierne a su contribución al valor absoluto del desplazamiento químico.

Por lo tanto, cuando se compara la diferencia entre los valores de los desplazamientos químicos de cada uno de los epímeros con los valores correspondien-

tes del compuesto carbonílico resulta de mayor magnitud en el caso del derivado 3 β -hidroxilado. El incremento teórico esperado sería:

$$3\alpha\text{OH} \rightarrow 3\text{CO}: -\text{CH} - \gamma(\text{OH}) + \gamma_{anti} = 1,89 \text{ ppm}$$

$$3\beta\text{OH} \rightarrow 3\text{CO}: -\gamma(\text{OH}) + \gamma_{anti} = 6,44 \text{ ppm}$$

C - EFFECTOS PRODUCIDOS POR EL CAMBIO DE LA CADENA LATERAL. CARACTERISTICAS CONFORMACIONALES.

En la tabla 9 se puede observar que, para todos los compuestos estudiados los carbonos 12, 13, 16, 17 y 18 son los más afectados por el cambio de la cadena lateral mientras que, tal como era previsible, las señales del resto de los carbonos no varían por encontrarse remotos al sitio de sustitución.

Cuando se comparan las señales de los carbonos 13 y 16 en esteroides del tipo 20-ceto pregnano (compuestos 19, 92, 100, 103 y 106) con las de los 5 β -androstano, se aprecia el efecto de desprotección producido por el sustituyente en carbono 17.

$$20\text{-ceto pregnano: } \delta\text{C-13} \approx 44 \text{ ppm}, \quad \delta\text{C-16} \approx 23 \text{ ppm}$$

$$5\beta\text{-androstano: } \delta\text{C-13} \approx 41 \text{ ppm}, \quad \delta\text{C-16} \approx 20 \text{ ppm}$$

La cadena lateral de los 20-ceto pregnanos adopta dos conformaciones preferidas que están en equilibrio por rotación alrededor del enlace C-17/C-20^{89,90}, pero aunque en una de ellas existe un eclipsamiento parcial entre el oxígeno y el grupo metileno de carbono 16, éste no constituye un factor desestabilizante de importancia⁸⁹. Esta conclusión surgió por comparación con el efecto de eclips-

samiento presente en la 2(ecuatorial)-metilciclohexanona donde el mismo ha sido considerado insignificante⁹¹.

La igualdad en el efecto $\gamma(\text{CO})$ también se observó para esteroides con cadena del tipo 21-hidroxi-20-ceto pregnano (compuestos 94 y 104), 21-acetoxi-20-ceto pregnano (compuestos 93 y 108) y 17 β -carboxilato de metilo (compuestos 96 y 105).

La comparación del desplazamiento químico del carbono 17 de todos los compuestos estudiados indica que los derivados de 20-ceto pregnanos presentan la señal desplazada a campos más bajos ($\delta \approx 64$ ppm). Esta desprotección no sólo se debe al grupo carbonilo en β , sino también a la relación 1,3-diaxial que existe entre el H-17 y los hidrógenos del carbono 21 que tiene libre rotación⁹² (figura 5).

Cuando se introduce un hidroxilo en el carbono 21 (compuestos 94 y 104) la señal del carbono 17 se desplaza a campos más altos ($\delta \approx 59$ ppm). Esto ocurre en parte por la desaparición de uno de los hidrógenos de carbono 21, pero también por la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el hidroxilo de carbono 21 y el oxígeno de carbono 20. De esta manera se restringe la libre rotación entre estos dos carbonos⁹², evitando así una interacción tan efectiva como la que existe en el caso en el que hay libre rotación.

El carbono 17 de los 21-acetoxi derivados (compuestos 93 y 108) presenta el mismo valor de desplazamiento químico que el de los 21-hidroxi-derivados. En este caso ya no hay posibilidad de formación de un puente de hidrógeno intramo-

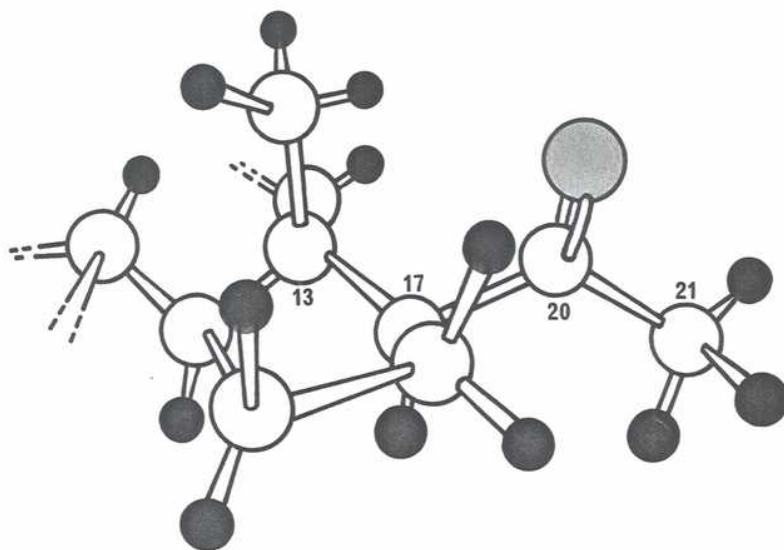


Figura 5: Conformación preferencial de la cadena lateral de los 20-ceto pregnanos en solución.

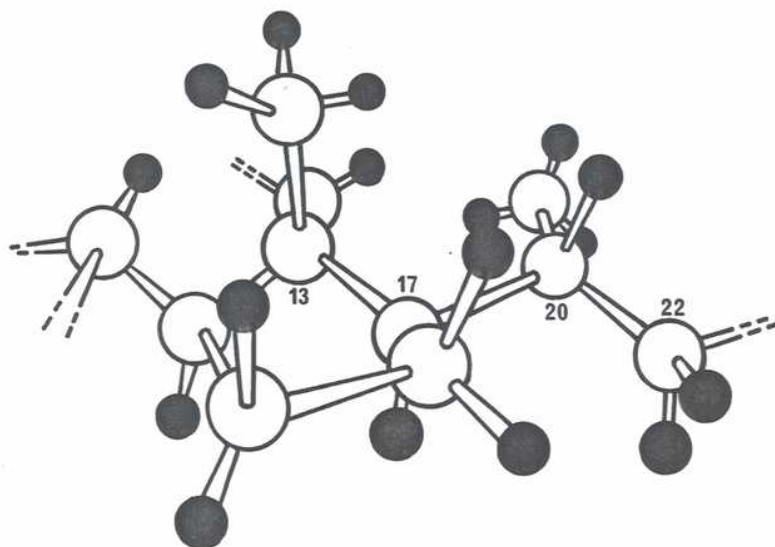


Figura 6: Conformación preferencial propuesta para la cadena lateral de los ácidos colánicos o derivados de los mismos en solución.

lecular, pero es factible que el grupo acetato resulte lo suficientemente voluminoso como para impedir también una libre rotación y una totalmente efectiva interacción de tipo 1,3-diaxial.

Los derivados de tipo ácido etiánico (compuestos 95, 96, 97, 106, 107 y 109) muestran un desplazamiento del carbono 17 aún a campos más altos ($\delta \approx 55$ ppm) siendo la única influencia ejercida la correspondiente a la sustitución con un carboxilato de metilo.

Los derivados de ácidos colánicos (compuestos 58, 59, 60, 61, 67, 68, 102 y 110) presentan una situación realmente diferente. La comparación con el 5 β -androstano indica una desprotección del carbono 13 ($\delta = 42,6$ ppm), similar a la observada anteriormente, pero un importante desplazamiento del carbono 16 a campos más bajos ($\delta = 28$ ppm). En este caso las diferencias observadas en los valores de desplazamiento químico no se pueden explicar solamente por factores electrónicos pues de ser así, tal como se ha comentado antes, la cadena lateral debería influir sobre ambos carbonos de la misma manera. Resulta evidente que dicha diferencia surge como consecuencia de factores estéricos. Teniendo en cuenta este hecho, se propuso que la cadena lateral de los ácidos colánicos o derivados de ellos adoptan en solución una conformación preferencial (figura 6) similar a la que adoptan los 20R-esteroides en solución⁹³. Esta conformación coincide con el rotámero favorecido para la cadena lateral del ácido cólico en estado cristalino, según se ha determinado por análisis de rayos X⁹⁴. Una disposición preferida similar también se ha propuesto para el colestano en estado cristalino⁹⁴.

En la disposición espacial propuesta se presenta una interacción 1,3-diaxial entre el hidrógeno de carbono 20 y el hidrógeno β de carbono 16. Esta interacción sería responsable de la desprotección del carbono 16 y del consiguiente desplazamiento de su señal a campos más bajos. Este desplazamiento resulta más importante que el que se observa en los 20-ceto derivados debido a que la interacción 1,3-diaxial planteada produce una desprotección mayor que el efecto de un carbonilo en β con la orientación que presenta la cadena del pregnano.

Cuando se compara el desplazamiento químico del carbono 13 de estos compuestos con el correspondiente al 5 β -androstano también se observa un corrimiento a campos más bajos pero mucho menor dado que, para el carbono 13, se debe exclusivamente a la sustitución en carbono 17.

El desplazamiento químico del carbono 16 en los derivados de ácidos colánicos analizados es similar al observado para el carbono 16 de 5 β -colestanos⁷⁷ y 5 β -pregnanos⁷⁷.

Es factible que el conformero favorecido en solución para estos compuestos sea el mismo que el que presentan en sus estructuras cristalinas y que, tal como ha sido demostrado por análisis de rayos X^{94} , la disposición espacial de sus cadenas laterales tenga el hidrógeno 20 *anti* con respecto al hidrógeno 17 α . Por lo tanto, existiría también una interacción 1,3-diaxial H-20/H-16 que sería, en este caso como en los anteriores, la responsable del desplazamiento a campos más bajos del valor de la resonancia del carbono 16.

El valor del desplazamiento químico para el carbono 13 de estos compuestos

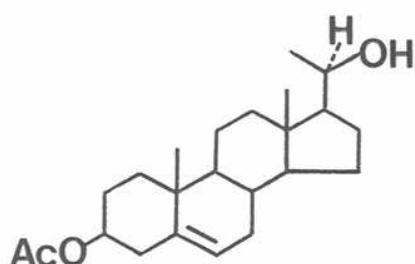
es coincidente con el encontrado para los ácidos colánicos en estudio.

En el siguiente cuadro se comparan los valores de desplazamiento químico de estos carbonos para diferentes compuestos, pudiendo observarse la desprotección sistemática que produce la interacción descripta en el carbono 16 de los esteroides que la presentan.

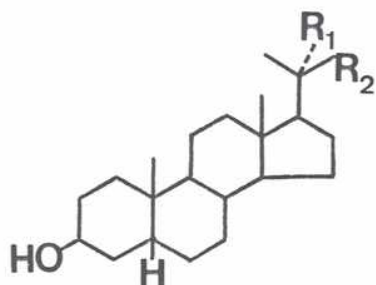
	C-13	C-16	INTERACCION H20/H16
5β-colestan-3α-ol	43,1	28,7	SI
5β-colestan-3β-ol	42,7	28,3	SI
5β-pregnano	42,3	28,3	SI
3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona	44,4	22,9	NO
3α-hidroxi-5β-pregnan-20-ona	44,4	22,9	NO
3β-acetoxi-5β-pregnan-20-ona	44,1	22,7	NO
3α-acetoxi-5β-colan-24-oato de metilo	42,7	28,1	SI
3-oxo-5β-colan-24-oato de metilo	42,5	28,0	SI
3α-hidroxi-5β-colan-24-oato de metilo	42,7	28,1	SI
3-oxo-5β-androstan-17β-carboxilato de metilo	44,2	23,7	NO
3β-hidroxi-5β-androstan-17β-carboxilato de metilo	44,3	23,9	NO
3α-hidroxi-5β-androstan-17β-carboxilato de metilo	44,3	23,8	NO

En el caso del 3 β -acetoxipregn-5-en-20R-ol⁹⁵ se ha demostrado por cálculos teóricos de energía de rotámeros⁹⁶ y por RMN-¹H^{97,98} que la cadena lateral adopta solamente un conformero favorecido con el hidrógeno 17 α casi *anti* al hidrógeno 20. Esta conformación hace posible una interacción entre el hidrógeno 20 y el hidrógeno 16 β , que junto con un pequeño efecto γ (OH) permiten explicar el desplazamiento químico del carbono 16 (δ = 26 ppm).

Por otro lado, compuestos sin hidrógeno en el carbono 20 como el 3 β ,20R-dihidroxi-23-norcolanato de metilo y su isómero 20S presentan la señal del carbono 16 a 23 ppm⁹⁵, un valor que se puede atribuir a la ausencia de la interacción discutida.



3 β -Acetoxipregn-5-en-20R-ol



$R_1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ y $R_2 = \text{OH}$

3 β ,20R-dihidroxi-23-norcolanato de metilo.

$R_1 = \text{OH}$ y $R_2 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$

3 β ,20S-dihidroxi-23-norcolanato de metilo.

La posibilidad de una interacción H-17/H-21 en el confórmero propuesto (figura 6) explica el desplazamiento a campos más altos del carbono 17 ($\delta = 56$ ppm) cuando se lo compara con los 20-ceto derivados. Además, no se puede descartar un posible eclipsamiento parcial H-17/H-22 e interacciones de tipo CC con el resto de la cadena lateral.

Se debe tener en cuenta que las interacciones mencionadas han sido descritas para anillos de seis miembros en conformaciones silla⁸⁶ y en este caso se está haciendo una extensión a partes acíclicas de las estructuras como son las cadenas laterales de los esteroides. A pesar de que ello no sería estrictamente válido, es razonable predecir su aplicación en el confórmero favorecido en solución ya que los datos obtenidos lo justifican ampliamente.

En el caso de la cadena lateral de compuestos esteroidales, la existencia de un rotámero principal se debe a la restricción de la libre rotación alrededor del enlace entre los carbonos 17 y 20 causada por una repulsión entre el CH₃-18 y cualquier grupo unido al carbono 20. Esta interacción estérica debe tener mayor energía que la mencionada antes entre el hidrógeno 20 y el hidrógeno 16 β .

ANALISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS PARA DERIVADOS 5 β -ESTEROIDALES

SUSTITUIDOS EN LOS CARBONOS 3 Y 7 , Y CON DIFERENTES CADENAS LATERALES

(TABLA 10)

En los sistemas esteroidales con fusión de anillos A/B *cis* el sustituyente α de carbono 7 tiene orientación axial, de manera que la introducción de un hidroxilo o un acetilo en esta posición tiene un marcado efecto sobre algunos carbonos a su alrededor.

La introducción de un hidroxilo en la mencionada posición influencia en forma diferente a ambos carbonos β (6 y 8). En el caso del carbono 6 se presenta una interacción entre el hidrógeno 6 α y el hidroxilo vecino ($H_O = 4,41$ ppm) además de una interacción CO ($C5-C6-C7-O7\alpha$) de menor magnitud (2,28 ppm). Esto da como resultado el desplazamiento de la señal a valores del orden de 34,7 ppm, tal como ocurre en el caso de los compuestos 50, 57 y 78 de la tabla 10. Cuando estas interacciones no existen el desplazamiento químico del carbono 6 es del orden de 26,5 ppm como puede apreciarse en la tabla 9.

Para el otro carbono β , el hidroxilo en posición axial introduce dos interacciones CO ($C9-C8-C7-O7\alpha$ y $C14-C8-C7-O7\alpha$). Ellas modifican su desplazamiento químico a un valor promedio para los compuestos 50, 57 y 78 del orden de 39,7 ppm (tabla 10) en comparación con el valor promedio de 35,7 ppm (tabla 9) para los que no la presentan.

La introducción del hidroxilo axial implica la pérdida de dos interaccio-

nes entre hidrógenos 1,3-diaxiales. Ello conduce a un desplazamiento de las señales de los carbonos 9 y 14 a campos más altos. Este efecto se ve incrementado por la aparición de una interacción $\gamma(\text{OH})$ sesgada (-1,28 ppm) en ambos casos. El cambio introducido se observa por comparación entre el valor de desplazamiento químico de estos carbonos en los compuestos de la tabla 9 (C-9: 40,25 ppm ; C-14: 56,15 ppm) y los datos de los respectivos carbonos en los compuestos 50, 57 y 78 de la tabla 10. La diferencia experimental obtenida, en promedio, fue de 7,2 ppm para el carbono 9 y 6,2 ppm para el carbono 14.

El carbono 5 se encuentra en relación $\gamma(\text{OH})$ sesgada respecto del hidroxilo de carbono 7, pero como el enlace C-7/O-7 es paralelo al enlace C-5/C-4, la hidroxilación no introduce cambios en el número de interacciones entre hidrógenos 1,3-diaxiales del carbono en cuestión. Es por ello que el único cambio producido en la señal es un desplazamiento de 1,28 ppm a campos más altos. Esta predicción coincide con los resultados obtenidos.

TABLA	COMPUESTO	C-4	C-5	TABLA	COMPUESTO	C-4	C-5
1	58	36,36	42,06	2	50	39,77	41,56
1	103	36,73	42,39	2	57	39,63	41,53
1	94	36,28	41,91				
1	95	34,54	42,15				

Finalmente la señal del carbono 4 muestra un desplazamiento a campos más bajos por la influencia que el sustituyente en δ ($\delta(\text{OH}) = 2,86 \text{ ppm}$) produce en

estos sistemas A/B *cis*. Tal como puede apreciarse en el cuadro de la página anterior, la variación teórica se ve avalada por los datos comparativos de los compuestos 58, 103, 94 y 95 que no presentan la interacción, frente a los compuestos 50 y 57 que la presentan.

El análisis de los valores de desplazamiento químico de los carbonos 3 y 7 de los compuestos de la tabla 10 indica una notoria diferencia entre ambos. Cuando se analizan las interacciones sesgadas para estos casos se obtienen resultados completamente distintos. En el caso del carbono 3, el hidroxilo con orientación α es ecuatorial y el hidrógeno 3 β interactúa con los hidrógenos diaxiales de los carbonos 1 y 5. Este hecho contribuye a desplazar el valor base para la señal de un alcohol secundario (60,99 ppm) a campos más bajos (2x4,55 ppm).

El hidroxilo en posición 7 α es axial y en este caso tres interacciones OC (07 α -C7-C8-C9 , 07 α -C7-C8-C14 y 07 α -C7-C6-C5) desplazan el valor base 3x1,97 ppm también a campos más bajos.

De acuerdo a los cálculos teóricos, la variación en los desplazamientos químicos de estos dos carbonos debería ser de 3,19 ppm, siendo mayor el correspondiente al carbono 3. Los resultados experimentales son los siguientes:

COMPUESTO	C-3	C-7	C3 - C7
50	71,94	68,52	3,42
57	71,81	68,33	3,48

La acetilación de ambos hidroxilos produce modificaciones similares en los dos carbonos. Las diferencias observadas anteriormente se mantienen.

COMPUESTO	C-3	C-7	C3 - C7
49	74,11	71,18	2,93
51	74,08	71,15	2,93
47	73,94	70,99	2,95
52	73,94	71,00	2,94

La acetilación produce en los carbonos β un desplazamiento de sus señales a campos más bajos, pero el orden de magnitud no es similar en todos los casos. Se calculó el valor promedio del desplazamiento químico para los carbonos 2, 4, 6 y 8 de los derivados diacetilados 49, 51, 47 y 52 y el correspondiente a los compuestos 50 y 57 con ambos hidroxilos libres. En el siguiente cuadro se muestran los resultados.

	C-2	C-4	C-6	C-8
VALOR PROMEDIO CON LOS HIDROXILOS ACETILADOS	26,79	34,63	31,28	37,90
VALOR PROMEDIO CON LOS HIDROXILOS LIBRES	30,69	39,70	34,76	39,86
DIFERENCIA ENTRE AMBOS VALORES	3,90	5,07	3,48	1,97

Se puede observar que el carbono 4 es el más afectado. La señal de este

carbono se desplaza por la introducción de un acetilo en posición 3 α pero es probable que colabore a ese desplazamiento la presencia del sustituyente voluminoso en carbono 7. Esto último resultaría como consecuencia de la unión *cis* entre los anillos A y B que provoca una proximidad espacial entre el carbono 4 y el acetilo de posición 7 α . Esta idea se vería apoyada por el hecho de que pares de compuestos de la tabla 9, como por ejemplo 58 y 60 , 103 y 92 ó 94 y 93 , con el hidroxilo 3 α libre y acetilado, muestran para el carbono 4 una diferencia de valores de desplazamiento químico prácticamente igual a la del carbono 2.

El carbono 8 presenta, por acetilación del hidroxilo de carbono 7, un cambio mucho menor. Esto podría deberse a que el único hidrógeno unido al carbono analizado es axial y está orientado hacia el lado β de la molécula, en dirección opuesta al sustituyente axial voluminoso de carbono 7, produciéndose en este caso una influencia estérica mucho menor.

EFFECTO DE LA DESHIDRATACION DE UN HIDROXILO 7 α Y LA INTRODUCCION DE
UN DOBLE ENLACE EN POSICION 8(14) (TABLA 10)

A continuación se discutirá el efecto producido como consecuencia de la deshidratación de un hidroxilo α en carbono 7 para dar lugar a un doble enlace en posición 8(14). En la presente sección las diferencias que se mencionarán entre valores de desplazamiento químico surgen de la comparación de los datos experimentales correspondientes a los compuestos 78 y 80, ya que la única diferencia estructural entre ambos es la involucrada en estudio.

Eggert y Djerassi⁷⁹ investigaron el cambio que origina en la resonancia de los carbonos la introducción de un doble enlace en distintas posiciones del esqueleto esteroideal. Compararon los valores observados con los predichos usando el conjunto de parámetros descritos por Beierbeck y colaboradores⁸⁶.

La introducción de un doble enlace en un sistema cíclico produce una distorsión conformacional apreciable, y en moléculas policíclicas de anillos condensados la deformación se propaga a través de los mismos. El grado de transmisión depende de la rigidez del anillo que contiene el doble enlace y de la cercanía de los anillos condensados. En el esqueleto esteroideal la flexibilidad de los cuatro anillos es muy diferente y por lo tanto, dobles enlaces en ciertas posiciones producen una transmisión sustancial de la distorsión, mientras que en otras el efecto es mucho menor. Por esta razón Eggert y Djerassi indicaron que en estructuras policíclicas como los esteroides, no hay una buena correlación

entre algunos valores observados y los calculados. Las mayores desviaciones las encontraron para el caso de dobles enlaces en el anillo C, que está condensado con un anillo de cinco miembros. En particular, los compuestos con el doble enlace en posición 8(14) presentan diferencias no sólo en los carbonos olefínicos sino también en los alílicos (β) y homoalílicos (γ). Esto justificaría las diferencias encontradas entre los datos experimentales y los teóricos que se detallan a continuación.

La deshidratación del hidroxilo en carbono 7 para dar la olefina en posición 8(14) se puede enfocar como dos modificaciones simultáneas. Por un lado, el reemplazo de un hidroxilo por un hidrógeno y por el otro, la introducción del doble enlace.

El carbono 6 es uno de los más afectados pues, como consecuencia del cambio, pierde la interacción del hidrógeno 6β con el hidrógeno 8β ($CH = 4,55$ ppm) que desaparece al formarse el doble enlace. Además se descuenta para este carbono una interacción de tipo HO ($4,41$ ppm) y una CO ($2,28$ ppm) que surgían por la presencia de un hidroxilo en el carbono vecino. Por último, también se modifica la señal por la presencia del doble enlace ($\gamma(\text{olef. anti}) = 5,23$ ppm). Estos factores permiten calcular un desplazamiento teórico de aproximadamente 6 ppm a campos más altos, aunque en realidad el observado fue aún mayor ($7,6$ ppm).

El hidrógeno 7α introduce una interacción de tipo 1,3-diaxial con el hidrógeno 9α . Para el carbono 9, este efecto se compensa con la pérdida de una interacción equivalente entre el hidrógeno 9α y el 14 que se elimina al formarse el do-

ble enlace. Por lo tanto, el desplazamiento de la señal del carbono en cuestión se debe al cambio de una interacción con un hidroxilo en γ (-1,28 ppm) por la producida por una olefina en el carbono vecino (3,86 ppm). Esto hace previsible un corrimiento teórico de la señal de 5,14 ppm a campos más bajos y podría justificar el desplazamiento experimental observado de 3,25 ppm en el sentido previsto.

El carbono 5 pierde la interacción que tenía con el hidroxilo en γ (-1,28 ppm) y el carbono 4 en δ (2,86 ppm). Esto explicaría el pequeño desplazamiento del carbono 5 a campos más bajos (0,69 ppm) y el desplazamiento mayor del carbono 4 en sentido inverso.

La señal del carbono 13 no muestra cambios apreciables pese a estar directamente unido a uno de los carbonos sp^2 . Esto respaldaría lo indicado por las reglas semiempíricas pues no está unido a hidrógenos y el parámetro β de olefinas no se aplica a carbonos sp^3 cuaternarios.

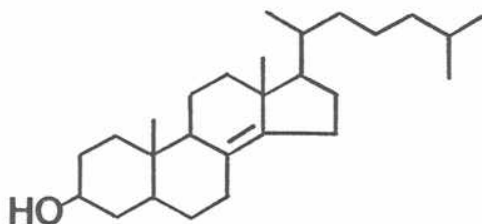
La señal del carbono 18, directamente unido al carbono 13, tiene un pronunciado corrimiento a campos más bajos (6,52 ppm). Este hecho puede deberse al efecto desprotector de la olefina, que se manifiesta en el parámetro γ de olefinas con la disposición espacial particular observada en este caso, indicada teóricamente como *anti*.

Los valores de desplazamiento químico de los carbonos 11 y 12 también se modifican por la introducción del doble enlace, pero en un orden de magnitud mucho menor ya que, la relación de estos carbonos con el mismo es la indicada en las

reglas semiempíricas como *syn* (1,41 ppm). Este efecto compensa parcialmente la pérdida, por parte de cada uno de estos carbonos, de una interacción entre hidrógenos 1,3-diaxiales (H-11 β con H-8 e H-12 α con H-14). La suma de estos factores justificaría el desplazamiento final a campos más altos de las dos señales en estudio, pero impediría justificar la diferente variación que se presenta entre ambos casos.

Los métodos utilizados en el presente trabajo para la asignación de los desplazamientos químicos de cada uno de los carbonos de los compuestos en estudio no permitieron una asignación inequívoca de los valores correspondientes para los carbonos 8 y 14, dado que ambos carbonos olefínicos son cuaternarios.

De acuerdo a datos de literatura Eggert⁷⁹ asigna el espectro del colest-8(14)-eno (111) el valor de desplazamiento químico más alto (141,9 ppm) al carbono 14 y el más bajo al carbono 8 (126,7 ppm) Para ello se basó en datos obtenidos utilizando reactivos de desplazamiento para la asignación de los carbonos olefínicos del 5 α -colest-8(14)-en-3 β -ol (112).



112

Coincidentemente, Tsuda y colaboradores⁷⁸ hacen el mismo tipo de asignación para el colest-8(14)-en-3 β -ol (C-8: 126,1 ppm , C-14: 142,4 ppm). Se debe remarcar que ambos autores trabajan con derivados 5 β -esteroidales.

En cambio, Tschesche y Fuhrer⁴³ asignaron para la 3 β -hidroxi-5 β -pregn-8(14)-en-20-ona (38) y su derivado acetilado, en forma respectiva, los siguientes valores: 128,7 y 128,1 para el carbono 14 y 139,5 y 139,7 para el carbono 8, sin aclarar específicamente en qué metodología basan su asignación.

Los compuestos analizados por Tschesche son derivados 5 β a diferencia de los 5 α considerados anteriormente. Si bien es factible que la modificación A/B *trans* a A/B *cis* produzca cambios conformacionales importantes, los datos para los autores están revertidos, pero son coincidentes.

Por otra parte, surgen discrepancias en la asignación realizada por Tschesche en el mismo trabajo para otros derivados esteroidales anteriormente descritos por varios autores. Por ejemplo, en el caso de progesterona, considera para el carbono 16 un desplazamiento químico de 38,7 ppm que se encuentra fuera de los límites de los valores normalmente encontrados para este carbono en compuestos de este tipo. Se piensa que ese dato se encuentra intercambiado con el asignado por el autor para el carbono 12 (24,4 ppm).

En el presente trabajo, si bien no se puede determinar inequívocamente, se asigna tentativamente 128,2 ppm para el carbono 8 y 138,9 ppm para el carbono 14.

EXPERIMENTAL

GENERALIDADES

Los puntos de fusión fueron determinados con un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de absorción en el IR se realizaron utilizando dos espectrofotómetros Perkin-Elmer, modelo 421 o modelo 710B, dispersando la muestra en Nujol.

Los espectros de RMN- ^1H se efectuaron a 100 MHz con un espectrómetro Varian XL-100-15 (salvo los casos indicados a 60 MHz con un espectrómetro Varian A-60). Los espectros de RMN- ^{13}C se realizaron con el equipo Varian XL-100-15 a 25,2 MHz por el método pulsado con transformada de Fourier, utilizando una computadora Varian 620/L-100 y una unidad de discos magnéticos Sykes 7000. El solvente empleado fue cloroformo deuterado (Cl_3CD) salvo en los casos en que se indique lo contrario y se usó tetrametilsilano como señal de referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Las señales se indican como singulete (s), doblete (d), triplete (t), multiplete (m), banda ancha (b.a.). Los espectros de RMN- ^{13}C se hicieron con soluciones 0,5-0,6 M, con un ancho de barrido de 5700 Hz usando pulsos de 45° y velocidad de repetición de pulsos de 0,71 segundos. Los espectros totalmente desacoplados de protones son el resultado de acumular 10000-15000 pulsos y se obtuvieron por irradiación del espectro de ^1H a una frecuencia central de 3 ppm. Las multiplicidades de las señales fueron determinadas por la técnica de ecos de

spin con desacople alternado (APT: test de protones vecinales⁹⁹) utilizando una secuencia de pulsos $90_{\pm x} - \tau - 180_{\pm y} - \tau - \text{FID}$ ($\tau = 7$ mseg) y cortando el desacoplador en el período entre dos pulsos.

Los compuestos 104 y 106 fueron adquiridos a Makor Chemicals Ltd.; los compuestos 58 y 107 se obtuvieron por metilación con diazometano de los ácidos correspondientes adquiridos a Makor Chemicals Ltd. Los compuestos 19 y 103 se aislaron desacetilando los compuestos 100 y 92 respectivamente mediante un calentamiento a reflujo con etanol y catálisis ácida. El compuesto 108 se preparó por acetilación del compuesto 104 con anhídrido acético y piridina a temperatura ambiente. El compuesto 110 se preparó por tratamiento del compuesto 58 con ácido fórmico en tetrahidrofurano a temperatura ambiente durante 20 hs. El compuesto 102 se obtuvo por saponificación (con hidróxido de potasio en etanol) seguida de tratamiento con diazometano del compuesto 68.

Los espectros de masa se realizaron a 70 eV en un espectrómetro de masa Varian-MAT CH7-A, comandado por una computadora Varian-MAT Data System 166, con unidades de salida TRC Tektronix 4010 e impresora Tektronix 4631. En todos los casos los espectros se realizaron por introducción directa de las muestras.

Las mediciones de radiactividad se llevaron a cabo en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb 3003, o en un Tracor Analytic Mark III. Las muestras se disolvieron en una mezcla de 1 ml de agua y 14 ml de solución centelleadora que contenía 100 g de naftaleno, 7,0 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 300 mg de 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)benzeno (dimetil-POPPOP) por litro

de solución en dioxano.

Las cromatografías en capa delgada analíticas se realizaron usando como fase fija silicagel G (Merck) y como reveladores vapores de yodo o solución acuosa de ácido sulfúrico al 50% con posterior calentamiento a 110°C. Para mayor resolución se emplearon placas cromatográficas comerciales de silicagel 60 F₂₅₄ sobre aluminio (Merck).

Las cromatografías en capa delgada preparativas (1-2 mm de espesor) se efectuaron utilizando silicagel PF₂₅₄ (Merck), observándolas luego de desarrolladas a la luz ultravioleta (254 nm). Para mayor resolución, en muestras radiactivas, se utilizaron placas cromatográficas comerciales de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) de 0,25 mm de espesor.

Las cromatografías en columna se realizaron utilizando como adsorbente silicagel Davison (malla 100-200).

Las cromatografías líquidas de alta resolución se efectuaron en un cromatógrafo líquido Micromeritics modelo 750, equipado con un detector de índice de refracción modelo 771. Se utilizó una columna Altex Ultrasphere ODS 5 µm (250 mm x 10 mm, d.i.) para cromatografía en fase reversa. El sistema de solvente empleado fue metanol-agua (9:1) con un flujo de 2 ml/minuto.

El I¹⁴CH₃ fue adquirido a The Radiochemical Centre Ltd., Amersham, Inglaterra.

Los solventes fueron evaporados a presión reducida. Las soluciones orgánicas fueron secadas por tratamiento con sulfato de magnesio anhidro.

Las reacciones de metilación se realizaron disolviendo o suspendiendo la muestra en metanol y agregando, gota a gota, una solución etérea de diazometano hasta persistencia del color amarillo. La solución amarilla se dejó tapada y en reposo durante 20 minutos y, luego de eliminar el exceso de reactivo con una corriente de nitrógeno, se evaporó el solvente a presión reducida.

El reactivo de Jones se preparó disolviendo 27 g de trióxido de cromo en una mezcla de 23 ml de ácido sulfúrico (c) y 100 ml de agua.

Los solventes de desarrollo para ccd analítica fueron: sistema 1: cloruro de metileno-metanol-ácido acético 97:3:0,05, sistema 2: tolueno-acetato de etilo 95:5, sistema 3: cloruro de metileno-metanol 99:1, sistema 4: benceno-acetato de etilo 4:1, sistema 5: cloroformo, sistema 6: cloruro de metileno-metanol 97:3, sistema 7: cloruro de metileno-metanol 95:5, sistema 8: cloruro de metileno-metanol-ácido acético 95:5:0,05, sistema 9: benceno-acetato de etilo 96:4, sistema 10: benceno-acetato de etilo 9:1, sistema 11: cloruro de metileno-metanol 98:2, sistema 12: cloruro de metileno-metanol-ácido acético 98:2:0,05, sistema 13: cloruro de metileno, sistema 14: cloruro de metileno-metanol 93:7, sistema 15: cloroformo-hexano 98:2.

Las técnicas experimentales utilizadas para el desarrollo de los estudios biosintéticos se encuentran descriptas en las páginas 91-95.

A - DEGRADACION DE LA CADENA LATERAL

A1 - DEGRADACION DEL ACIDO BILIAR AL 20-CETO PREGNANO

- Acido 3 α ,7 α -diacetoxi-5 β -colan-24-oico (48).

Método A:

50 mg de ácido quenodesoxicólico (41) se disolvieron en 2 ml de piridina anhidra y se agregaron 0,5 ml de anhídrido acético. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y con agitación durante 16 hs. Finalizado ese tiempo se comprobó por ccd (sistema: 1) que el reactivo de partida había desaparecido.

La mezcla de reacción se volcó sobre una solución de ácido clorhídrico (c) en agua (1:1), se extrajo con éter etílico y se lavó la fase orgánica hasta neutralidad. La fase etérea se secó y por evaporación del solvente se obtuvo un jarabe. Dicho jarabe se sometió a una reacción de metilación con diazometano por la técnica descripta. El análisis por espectroscopía infrarroja del producto obtenido indicó la presencia de grupos hidroxilo libres.

Método B:

Una mezcla de 50 mg de ácido quenodesoxicólico (41), 1 ml de ácido acético glacial y 0,5 ml de anhídrido acético se mantuvo a reflujo y con agitación durante 2 hs. El análisis de dicha mezcla por ccd (sistema: 1) indicó similares resultados a los obtenidos antes del aislamiento del producto según el método A.

Se duplicó el tiempo de calentamiento pero no se observaron cambios.

Método C:

A la mezcla de reacción descrita en el método B se le agregó 0,1 ml de ácido clorhídrico (c) como catalizador. La solución se mantuvo a reflujo durante 4 hs al cabo de las cuales se determinó por ccd (sistema: 1) que la reacción había dado los mismos resultados que en los casos anteriores.

Una prolongación en el tiempo de calentamiento a 8 hs no modificaba lo observado.

Método D:

Una solución de 1,5 g de ácido quenodesoxicólico (41) en 20 ml de anhídrido acético y 0,15 ml de ácido clorhídrico (c) se calentó a reflujo durante 1,5 hs. Se volcó sobre hielo y se filtró el precipitado obtenido. Dicho precipitado se recrystalizó de etanol acuoso aislándose 1,6 g (88%) del compuesto 48, homogéneo por ccd (sistema: 1). P.f. 200-203°C (lit¹⁰⁰: 206-208°C).

IR (cm⁻¹): 3300-2600 (O-H), 1740 (C=O, éster), 1710 (C=O, ácido).

RMN-¹H, ppm: 0,65 (s, 3H, CH₃-18), 0,94 (s, 3H, CH₃-19), 2,00 (s, 3H, CH₃CO₂-), 2,20 (s, 3H, CH₃CO₂-), 3,62 (s, 3H, -CO₂CH₃), 4,50 (b.a., 1H, H-3), 4,80 (b.a., 1H, H-7).

EM, m/z (%): 356 (M - 2AcOH, 11), 255 (M - 2AcOH - CL, 10), 213 (M - 2AcOH - anillo D, 6), 145 (6), 78 (100).

- Diacetato de 24-nor-5β-col-22-eno-3α,7α-diol (49).

A una solución de 800 mg (1,68 mmoles) de ácido 3α,7α-diacetoxi-5β-colan-

24-oico (48) en 30 ml de benceno anhidro mantenida a 50°C, se agregaron 80 mg de acetato cúprico y 0,01 ml de piridina anhidra y se llevó a ebullición con agitación y en atmósfera de nitrógeno. Se adicionaron 2,2 g (4,45 mmoles) de tetraacetato de plomo en cuatro porciones separadas por intervalos de una hora. Se mantuvo a reflujo una hora más y se filtró el sólido en suspensión. La solución resultante, de color verde, se lavó con solución acuosa de ácido clorhídrico al 5% para eliminar el acetato de cobre, luego con solución acuosa de bicarbonato de sodio al 10% y finalmente con agua hasta neutralidad. La fase orgánica se secó y por evaporación del solvente se obtuvo un jarabe de color marrón que se purificó por cromatografía en columna de silicagel usando tolueno como solvente de elución. Se aisló el compuesto 49 como un sólido cristalino (435 mg, 60%) homogéneo por ccd (sistema: 2) que se recrystalizó de metanol. P.f. 143-144°C (lit.⁴⁶: 134°C).

IR (cm^{-1}): 1740 (C=O).

RMN-¹H, ppm: 0,72 (s, 3H, CH₃-18), 0,94 (s, 3H, CH₃-19), 1,03 (d, J=6Hz, 3H, CH₃-21), 2,03 (s, 6H, CH₃CO₂-), 4,65 (b.a., 1H, H-3), 4,85 (b.a., 1H, H-7), 4,95 (m, 2H, CH₂-23), 5,65 (m, 1H, CH-22).

EM, m/z (%): 370 (M - AcOH, 12), 310 (M - 2AcOH, 89), 255 (M - 2AcOH - CL, 100), 213 (M - 2AcOH - anillo D, 16), 145 (24).

RMN-¹³C: ver tabla 10, pág. 123.

24-Nor-5 β -col-20(22)-eno-3 α ,7 α -diol (50).

Método A:

a) Purificación de la etilendiamina: se secaron 100 ml de etilendiamina sobre lentejas de hidróxido de potasio durante 24 hs y se destiló recogiendo la fracción de punto de ebullición 116°C. Esta fracción se guardó sobre filtros moleculares de 4 Å hasta el momento de la reacción.

b) Preparación del reactivo: 16,9 ml de etilendiamina se agitaron en atmósfera de nitrógeno durante 10 minutos y se inyectaron lentamente y con agitación 33 ml de solución de butil litio en hexano (14%).

c) Desarrollo de la reacción: al reactivo preparado como se indicó en b) se inyectaron 365 mg (0,85 mmoles) de la olefina 49 disueltos en 1,5 ml de benceno anhidro. La mezcla se calentó a reflujo durante 20 minutos, se enfrió, se diluyó con agua y se destiló a presión reducida para eliminar la etilendiamina excedente. El residuo se disolvió en 50 ml de éter etílico y la fase orgánica se lavó con agua (3x50 ml), se secó y se evaporó.

Tal como se discutió anteriormente, este método no dió el resultado esperado.

Método B:

a) Purificación de la etilendiamina: se secaron 200 ml de etilendiamina sobre lentejas de hidróxido de potasio durante 24 hs y se destiló recogiendo la fracción de punto de ebullición 116°C. Esta fracción se guardó sobre sodio a temperatura ambiente durante 48 hs. Después de ese período se reflujo la

mezcla durante una hora recogiendo sobre sodio la misma fracción de punto de ebullición 116°C. Todo el proceso (reflujo, destilación, reposo) se repitió tres veces. Por último se destiló y se usó de inmediato.

b) Preparación del reactivo: se agitaron 7,9 ml de etilendiamina en atmósfera de nitrógeno, calentando para mantener la temperatura entre 90 y 110°C. Se agregaron 234 mg de alambre de litio en porciones pequeñas. Luego de cada agregado la solución se coloreó de azul y después de un breve lapso de tiempo comenzó el desprendimiento de hidrógeno. El agregado de las sucesivas porciones de litio se efectuó cuando el burbujeo se había atenuado, independientemente del color de la solución. Una vez terminado el agregado y desaparecido el color azul, la temperatura se mantuvo entre 100 y 110°C durante 2 hs para completar la formación del reactivo.

c) Desarrollo de la reacción: se calentó la solución anterior a 125-130°C, se intensificó la corriente de nitrógeno y se agregó 1,2 g de la olefina envuelta en un sobre de papel de filtro que se abrió adentro del balón con la ayuda de una varilla. Se agitó durante 15 minutos a la temperatura indicada y luego se volcó en un vaso con hielo picado. El producto se separó por extracción con cloruro de metileno, se lavó la fase orgánica con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvo un sólido blanco cristalino, homogéneo por ccd (sistema: 3) que se recrystalizó con éter de petróleo para dar 825 mg (85%) de *50*. P.f. 177-178°C (lit.⁴⁶: 178°C).
IR (cm⁻¹): 3300 (O-H).

RMN- ^1H , ppm: 0,53 (s, 3H, CH_3 -18), 0,90 (s, 3H, CH_3 -19), 1,58 (d, $J=6\text{Hz}$, CH_3 -23),
 1,61 (s, 3H, CH_3 -21), 3,60 (b.a., 1H, H-3), 3,80 (b.a., 1H, H-7),
 5,20 (m, 1H, CH-22).

RMN- ^{13}C : ver tabla 10, pág. 123.

EM, m/z (%): 346 (M, 45), 328 (M - H_2O , 31), 310 (M - $2\text{H}_2\text{O}$, 20), 231 (M - H_2O -
 anillo D, 8), 213 (M - $2\text{H}_2\text{O}$ - anillo D, 20), 87 (100).

- Diacetato de 24-nor-5 β -col-20(22)-eno-3 α ,7 α -diol (51).

Se disolvieron 500 mg del compuesto 50 en 10 ml de anhídrido acético y se agregó 0,1 ml de ácido clorhídrico (c). La solución se calentó a reflujo con agitación durante 1,5 hs y se volcó sobre hielo. Se filtró y secó el precipitado obtenido. Su recristalización de metanol rindió 560 mg (90%) del acetato 51, homogéneo por ccd (sistema: 2). P.f.: 130-131°C.

Los valores de R_f en ccd de los isómeros 49 y 51 coinciden, pero revelados los cromatogramas con ácido sulfúrico y calor, el isómero 49 da una mancha de color rojo ladrillo, mientras que la mancha correspondiente a 51 es de color verde.

IR (cm^{-1}): 1745 ($\text{C}=\text{O}$).

RMN- ^1H , ppm: 0,52 (s, 3H, CH_3 -18), 0,93 (s, 3H, CH_3 -19), 1,58 (d, $J=6\text{Hz}$, CH_3 -23),
 1,62 (s, 3H, CH_3 -21), 2,02 (s, 3H, CH_3CO_2 -), 2,06 (s, 3H, CH_3CO_2 -),
 4,55 (b.a., 1H, H-3), 4,85 (b.a., 1H, H-7), 5,20 (m, 1H, CH-22).

RMN- ^{13}C : ver tabla 10, pág. 123.

EM, m/z (%): 430 (M, 1,3), 370 (M - AcOH, 12), 310 (M - 2AcOH, 10), 253 (M - 2AcOH - anillo D, 17), 43 (100).

- 3 α ,7 α -Diacetoxi-5 β -pregnan-20-ona (47).

Método A:

Se disolvieron 500 mg del compuesto 51 en 10 ml de cloruro de metileno (secado previamente sobre filtros moleculares). La solución se enfrió con una mezcla de hielo y cloruro de sodio hasta alcanzar una temperatura aproximada de -10°C. Se inició entonces un burbujeo de ozono a través de la solución, continuándose el mismo hasta 5 minutos después de obtener una coloración celeste en el medio de reacción. Se evaporó el solvente y el jarabe residual se disolvió en 10 ml de acetona. La ruptura del ozónido se efectuó a 0°C agregando reactivo de Jones gota a gota y con agitación hasta persistencia del color marrón rojizo. La mezcla se dejó a temperatura ambiente 5 minutos, se diluyó con agua (30 ml) y se extrajo el producto con cloruro de metileno (2x50 ml). El extracto orgánico se lavó y secó y se evaporó el solvente. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de silicagel usando como solvente de elución una mezcla de tolueno y acetato de etilo (9:1). Se aislaron 385 mg (79%) de la cetona 47, homogénea por ccd (sistema: 4), que se recrystalizaron con hexano. P.f. 140-141°C (lit.¹⁰⁰:133-134°C, éter-hexano).

IR (cm⁻¹): 1745 (C=O, éster), 1705 (C=O, cetona).

RMN-¹H, ppm: 0,61 (s, 3H, CH₃-18), 0,93 (s, 3H, CH₃-19), 2,02 (s, 3H, CH₃CO₂-),

2,04 (s, 3H, CH₃CO₂-), 2,10 (s, 3H, CH₃-21), 4,55 (b.a., 1H, H-3),
4,85 (b.a., 1H, H-7).

RMN-¹³C: ver tabla 10, pág. 123.

EM, m/z (%): 358 (M - AcOH, 3), 298 (M - 2AcOH, 5), 283 (M - 2AcOH - CH₃, 15),
255 (M - 2AcOH - CL, 16), 213 (M - 2AcOH - anillo D, 15), 43 (100).

Método B:

Se disolvieron 112 mg del diacetato de 24,24-difenil-5β-cola-20(22),23-dieno-3α,7α-diol (46) (ver pág. 163) en 1 ml de ácido acético glacial. Se enfrió la solución a 0°C y se agregaron 73 mg de trióxido de cromo. Se mantuvo con agitación a esa temperatura una hora y luego 15 hs a temperatura ambiente. El exceso de oxidante se eliminó por agregado de 0,5 ml de metanol. Se agregaron 20 ml de agua y se extrajo con éter etílico (2x20 ml). El extracto orgánico se lavó, secó y por evaporación del solvente se obtuvo un residuo que se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: tolueno y tolueno-acetato de etilo 95:5). Se obtuvieron 22 mg (28%) de la cetona 47, cuyas características espectroscópicas coincidían con las del mismo compuesto sintetizado según el método A.

- Diacetato de 24,24-difenil-5β-col-23-eno-3α,7α-diol (44) y 3α-acetoxi-24,24-difenil-5β-col-23-en-7α-ol (45).

En un balón de dos bocas se colocaron 7,5 g (47,7 mmoles) de bromobenceno, 1 g (41,6 mmoles) de magnesio (previamente desengrasado con éter etílico anhi-

dro) y 13 ml de éter etílico anhidro. Se agitó la suspensión en atmósfera de nitrógeno y una vez consumido el magnesio, se agregó lentamente una solución de 1,07 g (2,63 mmoles) de 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (43) en 15 ml de benceno anhidro, gota a gota desde una ampolla compensadora. Se calentó a reflujo durante 3 hs y luego se volcó sobre una mezcla de 10 ml de agua y 7,5 ml de ácido clorhídrico (c) a 0°C. Se separó la fase orgánica y la acuosa se extrajo con éter etílico (2x30 ml). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con agua hasta neutralidad y se arrastraron con vapor de agua para eliminar el bifenilo. El residuo crudo de la destilación se extrajo con éter etílico; la solución se secó y se evaporó el solvente. El análisis del residuo por ccd (sistema: 7) demostró la presencia de dos compuestos principales, diferentes ambos del éster de partida. Este residuo se trató con 5 ml de ácido acético glacial y 2,5 ml de anhídrido acético calentando a reflujo durante 2 hs. La solución se volcó sobre 20 ml de agua y se filtró el precipitado marrón obtenido, que posteriormente se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: cloruro de metileno). Se aislaron así 540 mg (37%) del compuesto 45 y 107 mg (7%) del compuesto 44.

Datos espectroscópicos correspondientes al compuesto 44:

IR (cm^{-1}): 3050-3000 (C-H, aromático), 1730 (C=O), 1600 (C=C).

RMN- ^1H (60 MHz), ppm: 0,65 (s, 3H, CH₃-18), 0,94 (s, 3H, CH₃-19), 2,01 (s, 6H, CH₃CO₂-), 4,60 (b.a., 1H, H-3), 4,90 (b.a., 1H, H-7), 6,15 (m, 1H,

CH-23), 7,05-7,50 (m, 10H, sistema aromático).

EM, m/z (%): 536 (M - AcOH, 20), 476 (M - 2AcOH, 4), 461 (M - 2AcOH - CH₃, 3),
315 (M - AcOH - CL, 11), 255 (M - 2AcOH - CL, 11), 193 (100).

Datos espectroscópicos correspondientes al compuesto 45 :

IR (cm⁻¹): 3450 (O-H), 3050-3000 (C-H, aromático), 1730 (C=O), 1600 (C=C).

RMN-¹H (60 MHz), ppm: 0,65 (s, 3H, CH₃-18), 0,92 (s, 3H, CH₃-19), 2,00 (s, 3H, CH₃CO₂-), 3,80 (b.a., 1H, H-7), 4,55 (b.a., 1H, H-3), 6,10 (m, 1H, CH-23), 7,05-7,50 (m, 10H, sistema aromático).

- Diacetato de 24,24-difenil-5β-cola-20(22),23-dieno-3α,7α-diol (46).

A una solución de 200 mg (0,34 mmoles) del compuesto 44 en 2,5 ml de tetracloruro de carbono, se agregaron 63 mg (0,36 mmoles) de N-bromosuccinimida. La mezcla se calentó a reflujo durante 15 minutos irradiando con una lámpara de luz visible de 500 Watts. Se enfrió y se filtró la succinimida libre. El filtrado se llevó a sequedad por evaporación del solvente y el residuo obtenido se disolvió en 2,5 ml de acetona. Luego de agregar 105 mg de ioduro de potasio, se dejó 48 hs a temperatura ambiente. Se filtró la sal obtenida y en el filtrado se redujo el iodo con bisulfito de sodio. Se evaporó el solvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: benceno-acetona, 100:1). Se aislaron 135 mg (68%) del compuesto 46, puro por ccd (sistema: 3).

IR (cm⁻¹): 3050-3000 (C-H, aromático), 1735 (C=O), 1600 (C=C).

RMN-¹H, ppm: 0,54 (s, 3H, CH₃-18), 0,91 (s, 3H, CH₃-19), 2,00 (s, 3H, CH₃CO₂-),

2,02 (s, 3H, CH_3CO_2^-), 4,55 (b.a., 1H, H-3), 4,90 (b.a., 1H, H-7), 7,00-7,50 (m, 10H, sistema aromático).

A2 - DEGRADACION DEL 20-CETO PREGNANO AL ACIDO ETIANICO

- $3\alpha,7\alpha,21$ -Triacetoxi- 5β -pregnan-20-ona (52).

Se disolvieron 200 mg (0,48 mmoles) de $3\alpha,7\alpha$ -diacetoxi- 5β -pregnan-20-ona (47) en 8 ml de benceno anhidro. A la solución se agregaron 400 mg (0,90 mmoles) de tetraacetato de plomo, 0,36 ml de metanol y 1,12 ml de eterato de trifluoruro de boro y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 hs. Se volcó sobre 50 ml de agua y se extrajo el producto con cloruro de metileno (3x30 ml). El extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvo un jarabe que se recristalizó de etanol. Se aislaron 162 mg (71%) del compuesto 52 como un sólido cristalino homogéneo por ccd (sistema: 4). P.f. 156-157°C.

IR (cm^{-1}): 1730 (C=O, éster), 1710 (C=O, cetona).

RMN- ^1H , ppm: 0,66 (s, 3H, CH_3 -18), 0,94 (s, 3H, CH_3 -19), 2,04 (s, 3H, CH_3CO_2^-), 2,06 (s, 3H, CH_3CO_2^-), 2,18 (s, 3H, $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$), 4,55 (b.a., 1H, H-3), 4,60 (c_{AB} , $J=17$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$), 4,90 (b.a., 1H, H-7).

RMN- ^{13}C : ver tabla 10, pág. 123.

EM, m/z (%): 416 (M - AcOH, 1), 403 (M - AcOH - CH_3 , 37), 356 (M - 2AcOH, 4), 315 (M - AcOH - CL, 6), 296 (M - 3AcOH, 2), 255 (M - 2AcOH - CL,

100), 213 (M - 2AcOH - anillo D, 5).

- 3 α ,7 α -Dihidroxi-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (57).

a) Etanólisis de los acetatos de C-3 y C-21:

Se disolvieron 150 mg del compuesto 52 en 10 ml de etanol y se agregaron 0,2 ml de ácido sulfúrico (c). La solución se calentó a reflujo durante 24 hs y se volcó sobre 30 ml de agua. Se extrajo el producto con acetato de etilo (2x50 ml), el extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvieron 118 mg de un residuo no cristalino.

b) Ruptura del enlace entre C-20 y C-21:

Se disolvieron 100 mg del jarabe residual de la reacción anterior en 5 ml de metanol y se agregó una solución de 200 mg de periodato de sodio en 2 ml de agua. La mezcla se agitó a temperatura ambiente observándose la paulatina aparición de un precipitado blanco cristalino. Luego de 3 hs de reacción se volcó sobre agua (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2x50 ml). El extracto orgánico se lavó con agua (2x30 ml), se secó y finalmente se evaporó el solvente obteniéndose 91 mg de producto.

c) Saponificación del acetato de C-7:

Se calentaron a reflujo 90 mg del jarabe obtenido según se indica en b) con 20 ml de solución de hidróxido de potasio 3% en etanol, durante 4 hs. Se volcó la solución final sobre 30 ml de agua

fría (0°C) y se acidificó la mezcla por agregado de ácido clorhídrico (c), gota a gota. Se extrajo el producto con acetato de etilo (2x50 ml), se lavó el extracto con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvo un jarabe que se metiló con la técnica antes descripta. El producto metilado se purificó por recristalización con benceno-hexano, aislándose 68 mg del compuesto 57 como un sólido blanco cristalino, que presentaba una sola mancha en ccd (sistema: 14). P.f. 149-151°C (lit.¹⁰¹: 152-154°C).

El rendimiento del proceso global (etanólisis, ruptura, saponificación) fue 62%.

IR (cm^{-1}): 3400 (O-H), 1735 (C=O).

RMN-¹H, ppm: 0,66 (s, 3H, CH₃-18), 0,91 (s, 3H, CH₃-19), 3,50 (b.a., 1H, H-3), 3,68 (s, 3H, -CO₂CH₃), 3,90 (b.a., 1H, H-7).

RMN-¹³C: ver tabla 10, pág. 123.

EM, m/z (%): 350 (M, 1), 332 (M - H₂O, 12), 314 (M - 2H₂O, 100), 299 (M - 2H₂O - CH₃, 85), 273 (M - H₂O - CL, 24), 254 (M - 2H₂O - HCO₂CH₃, 13), 213 (M - 2H₂O - anillo D, 57).

B - INVERSION DE LA CONFIGURACION DEL CARBONO 3

B1 - INVERSION POR OXIDACION Y REDUCCION

- 3-Oxo-5 β -colan-24 oato de metilo (59).

Se disolvieron 100 mg de litocolato de metilo (58) en 100 ml de acetona con 5% de ácido acético. Se enfrió la solución a 0°C y se agregó el reactivo de Jones gota a gota y con agitación hasta persistencia del color marrón rojizo. La mezcla se mantuvo 5 minutos a temperatura ambiente y luego de diluir con 50 ml de agua, se extrajo con cloruro de metileno (2x40 ml). El extracto orgánico se lavó con agua (30 ml), con solución acuosa de bicarbonato de sodio 5% (30 ml) y finalmente con agua hasta neutralidad. Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo que se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: cloruro de metileno) pues presentaba una pequeña impureza en el origen. Se obtuvieron 93,5 mg (94%) de la cetona 59, que se recrystalizaron de etanol.

P.f. 98-100°C.

IR (cm^{-1}): 1740 (C=O, éster), 1710 (C=O, cetona).

RMN- ^1H , ppm: 0,70 (s, 3H, CH_3 -18), 0,93 (d, $J=6\text{Hz}$, 3H, CH_3 -21), 1,04 (s, 3H, CH_3 -19), 3,69 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$).

RMN- ^{13}C : ver tabla 9, pág. 118.

- 3 α -Acetoxi-5 β -colan-24-oato de metilo (60) y 3 β -acetoxi-5 β -colan-24-oato de metilo (61).

Se disolvieron 100 mg del compuesto 59 en 80 ml de ácido acético y se agregaron 4 gotas de ácido clorhídrico (c) y 30 mg de óxido de platino. La mezcla se hidrogenó a temperatura ambiente y presión atmosférica durante 14 hs. Se filtró y el filtrado se volcó sobre 50 ml de agua. El producto se extrajo con acetato de etilo (2x50 ml) y el extracto orgánico se lavó con agua (40 ml), solución acuosa de bicarbonato de sodio 5% (2x40 ml) y agua hasta neutralidad. Luego de secarlo se evaporó el solvente aislándose 108 mg (97%) de la mezcla epimérica de 60 y 61. Esta mezcla, que resultó homogénea por ccd (sistema: 5) se recristalizó de etanol. P.f. 108-118°C.

IR (cm^{-1}): 1740 (C=O).

RMN- ^1H , ppm: 0,66 (s, CH_3 -18 de 60 y 61), 0,92 (d, $J=6\text{Hz}$, CH_3 -21 de 60 y 61), 0,94 (s, CH_3 -19 de 60), 0,98 (s, CH_3 -19 de 61), 2,04 (s, CH_3CO_2 -), 2,06 (s, CH_3CO_2 -), 3,68 (s, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4,70 (b.a., H-3 de 60), 5,40 (b.a., H-3 de 61).

B2 - INVERSION DIRECTA CON AZODICARBOXILATO DE ETILO

- 3 β -Formiloxi-7 α -hidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (62).

Se disolvieron 400 mg (0,99 mmoles) de quenodesoxicolato de metilo (43) en 12 ml de tetrahidrofurano anhidro y se agregaron 0,074 ml (1,96 mmoles) de ácido

fórmico y 524 mg de trifenilfosfina. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente y se adicionó, con un goteo lento, una solución de 0,45 ml de azodicarboxilato de etilo en 2 ml de tetrahidrofurano anhidro. El sistema se mantuvo con agitación durante 14 hs. Por evaporación del tetrahidrofurano a presión reducida se obtuvo un jarabe que se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: tolueno). Se aislaron 96 mg (20%) de un producto homogéneo por ccd (sistema: 6) que por recristalización de etanol dio p.f. 107-108°C.

IR (cm^{-1}): 3500 (O-H), 1735 (C=O).

RMN- ^1H , ppm: 0,66 (s, 3H, CH_3 -18), 0,93 (d, $J=6\text{Hz}$, 3H, CH_3 -21), 0,97 (s, 3H, CH_3 -19), 3,64 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3,80 (b.a., 1H, H-7), 5,25 (b.a., 1H, H-3), 8,05 (s, 1H, HCO_2^-).

B3 - INVERSION POR UNA REACCION DE SUSTITUCION

- 3 α -Tosiloxi-5 β -colan-24-oato de metilo (67).

A 150 mg (0,38 mmoles) de litocolato de metilo (58) disueltos en 5 ml de piridina anhidra, se agregó una solución de 320 mg (1,68 mmoles) de cloruro de p-toluensulfonilo (recientemente recristalizado) en 2 ml de piridina anhidra. La mezcla se mantuvo durante una noche a temperatura ambiente y luego se volcó sobre una solución de 8 ml de ácido clorhídrico (c) en 10 ml de agua a 0°C. Se agitó durante 5 minutos y se extrajo con cloruro de metileno. El extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvo

un jarabe que se recrystalizó de metanol. Se aislaron 177 mg (85%) del compuesto **67** como un producto cristalino y homogéneo por ccd (sistema: 2).

P.f. 103,5-105°C.

IR (cm^{-1}): 1730 (C=O), 1600 (C=C).

RMN- ^1H , ppm: 0,62 (s, 3H, CH_3 -18), 0,88 (s, 3H, CH_3 -19), 0,89 (d, $J=5\text{Hz}$, 3H, CH_3 -21), 2,44 (s, 3H, CH_3 - C_6H_4 -), 3,68 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 7,30-7,80 (m, 4H, sistema aromático).

RMN- ^{13}C : ver tabla 9 , pág. 117.

- 3 β -Formiloxi-5 β -colan-24-oato de metilo (**68**).

Se disolvieron 100 mg del compuesto **67** en 5 ml de N,N-dimetilformamida y la mezcla se calentó en un tubo tapado a 76-78°C durante 48 hs. Se volcó la solución en agua y se extrajo con cloruro de metileno (2x30 ml). El extracto orgánico se lavó repetidas veces con agua (8x50ml) y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo que se purificó por cromatografía en placa preparativa (solvente de desarrollo: tolueno-acetato de etilo 96:4). Se aislaron 57 mg (74%) del compuesto **68** , homogéneo por ccd (sistema: 9).

IR (cm^{-1}): 1735 (C=O).

RMN- ^1H , ppm: 0,66 (s, 3H, CH_3 -18), 0,91 (d, $J=6\text{Hz}$, 3H, CH_3 -21), 0,98 (s, 3H, CH_3 -19), 3,68 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 5,15 (b.a., 1H, H-3), 8,09 (s, 1H, HCO_2 -).

RMN- ^{13}C : ver tabla 9 , pág. 117.

C - DESHIDRATACION DEL HIDROXILO DE CARBONO 7 E ISOMERIZACION DEL DOBLE ENLACE FORMADO A LA POSICION 8(14)

- 7 α -Hidroxi-3 α -metilsuccinoxi-5 β -colan-24-oato de metilo (70).

A una solución de 260 mg (2,6 mmoles) de anhídrido succínico en 5 ml de piridina anhidra, se le agregaron 100 mg (0,25 mmoles) de quenodesoxicolato de metilo (43). El sistema se calentó a reflujo durante 45 minutos y se volcó sobre una solución de 5,5 ml de ácido clorhídrico (c) en 15 ml de agua a 0°C, agitando y macerando periódicamente durante 45 minutos. Se decantó la solución y se disolvió el sólido en cloroformo. El extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvo un jarabe que se metiló con la técnica antes descripta. El producto metilado se recrystalizó de metanol obteniéndose 93 mg (73%) del compuesto 70 como un sólido blanco cristalino, homogéneo por ccd (sistema: 7). P.f. 108-110°C

IR (cm^{-1}): 3500 (O-H), 1735 (C=O).

RMN- ^1H , ppm: 0,65 (s, 3H, CH_3 -18), 0,90 (s, 3H, CH_3 -19), 2,46 (s, 4H, $-\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-$), 3,62 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3,65 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3,85 (b.a., 1H, H-7), 4,60 (b.a., 1H, H-3).

EM, m/z (%): 505 (M - CH_3 , 1), 502 (M - H_2O , 1), 388 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$, 20), 373 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$ - CH_3 , 100), 370 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$ - H_2O , 17), 346 (M - H_2O - anillo D, 3), 255 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$ - H_2O - CL, 16).

3 α -Metilsuccinoxi-5 β -col-7-en-24-oato de metilo (71) y 3 α -metilsuccinoxi-5 β -col-8(14)-en-24-oato de metilo (72).

Método A:

Se disolvieron 150 mg (0,29 mmoles) del compuesto 70 en 5 ml de acetona anhidra (secada sobre filtros moleculares) y se agregaron 210 mg (1,55 mmoles) de cloruro de zinc anhidro (secado por calcinación inmediatamente antes de ser usado). Una vez mezclados los reactivos, se destiló parte de la acetona hasta obtener un jarabe, se repuso nueva acetona anhidra en el balón y se continuó con la destilación. La secuencia de destilaciones y agregados de acetona al jarabe se repitió tantas veces como fue necesario hasta comprobar por ccd (sistema: 5) la completa desaparición de 70 (para 150 mg de esteroide se necesitan aproximadamente tres destilaciones). Al jarabe final, de color amarillo claro, se agregaron 4 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 10% y se extrajo el producto con cloruro de metileno (2x50 ml). Se lavó el extracto orgánico con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo que se recristalizó de metanol, aislándose 115 mg (79%) de una mezcla de los compuestos 71 y 72 que se comportó como homogénea por ccd (sistema: 5). P.f. 86-90°C.

IR (cm⁻¹): 1735 (C=O).

RMN-¹H, ppm: 0,54 (s, CH₃-18 de 71), 0,82 (s, CH₃-19 de 72), 0,84 (s, CH₃-18 de 72), 0,93 (d, J=6Hz, 3H, CH₃-21), 0,94 (s, CH₃-19 de 71), 2,57 (s, -O₂CCH₂CH₂CO₂-), 3,63 (s, -CO₂CH₃), 3,65 (s, -CO₂CH₃), 4,70 (b.a.,

H-3), 5,05 (b.a., H-7).

Los isómeros 71 y 72 no se separaron por ccd con varios sistemas de solventes ensayados.

Método B:

Se disolvieron 100 mg de ácido 7 α -hidroxi-3 α -succinoxi-5 β -colánico (70) en 0,5 ml de ácido acético glacial y a la solución incolora se le agregaron 1,5 ml de ácido clorhídrico (c). La suspensión blanca resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 hs y se volcó sobre 25 ml de agua. Se extrajo con acetato de etilo (2x50 ml), y el extracto orgánico se lavó con agua (3x50 ml) y se secó. Se evaporó el solvente obteniéndose un residuo en el cual se observó por ccd (sistema: 8) que la mayor parte del alcohol no había reaccionado.

- 3 α -Metilsuccinoxi-5 β -col-8(14)-en-24-oato de metilo (72).

a) Preparación del reactivo: se agregó ácido sulfúrico (c) gota a gota sobre bisulfito de sodio. El dióxido de azufre gaseoso desprendido se secó por pasaje sobre ácido sulfúrico (c) y se recogió en un tubo de vidrio refrigerado a -60°C. Cuando el tubo contenía aproximadamente 3 ml de líquido, se lo cerró a la llama.

b) Desarrollo de la reacción: en un tubo de vidrio Pyrex de 30 cm de largo, 0,9 cm de diámetro interno y 0,1 cm de espesor, se colocaron 100 mg de la mezcla aproximadamente equimolecular de las olefinas 71 y 72, que se obtuvo como producto de la reacción de deshidratación con cloruro de zinc (pág. 172). Se enfrió

a -60°C el tubo cerrado conteniendo el dióxido de azufre líquido y se abrió. Se volcó cuidadosamente el dióxido de azufre sobre la mezcla de olefinas contenida en el otro tubo, enfriado también a -60°C . Se cerró el último tubo a la llama, se lo colocó en un horno y se elevó la temperatura del mismo hasta 100°C en un lapso de 40 minutos. Después de 24 hs de calentamiento, se abrió el tubo a -60°C trasvasándose la solución final de color marrón a un balón a 25°C donde rápidamente se evaporó el dióxido de azufre. Se lavó el tubo con cloruro de metileno y se juntaron las soluciones de lavado en el balón, evaporándose posteriormente el solvente. El jarabe residual se purificó por cromatografía en columna de sílicagel (solvente de elución: cloruro de metileno). Se obtuvieron 75 mg (75%) del compuesto 72 puro, que luego de una recristalización de etanol tuvo p.f. $128-130^{\circ}\text{C}$.

IR (cm^{-1}): 1735 ($\text{C}=\text{O}$).

RMN- ^1H , ppm: 0,82 (s, 3H, CH_3 -19), 0,85 (s, 3H, CH_3 -18), 0,94 (d, $J=6\text{Hz}$, 3H, CH_3 -21), 2,58 (s, 4H, $-\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-$), 3,62 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3,64 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4,75 (b.a., 1H, H-3).

EM, m/z (%): 502 (M, 18), 387 (M - CL, 53), 370 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$, 100), 355 (M - CL - 32, 36), 255 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$ - CL, 85).

D - OBTENCION DEL 20-CETO PREGNANO A PARTIR DEL ACIDO ETIANICO

- Anhídrido mixto acético y 3 β -acetoxiandroster-5-en-17 β -carboxílico (77).

Método A:

Se suspendieron 50 mg de ácido 3 β -hidroxiandroster-5-en-17 β -carboxílico (73) en 5 ml de anhídrido acético y se agregaron 2 gotas de ácido clorhídrico (c). Se calentó a reflujo durante una hora y se volcó sobre 50 ml de agua. Luego de agitar durante 10 minutos, se extrajo el producto con cloruro de metileno (2x40 ml). El extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad, se secó y posteriormente se evaporó el solvente. El residuo se recrystalizó de benceno-hexano, aislándose 58 mg (92%) del compuesto 77, que resultó homogéneo por ccd (sistema: 12). P.f. 253-254°C.

IR (cm⁻¹): 1805 y 1750 (C=O, anhídrido), 1735 (C=O, éster).

EM, m/z (%): 342 (M - AcOH, 99), 327 (M - AcOH - CH₃, 22), 299 (M - AcOH - CH₃CO, 17), 255 (M - AcOH - CL, 17), 43 (100).

Método B:

Se disolvieron 50 mg de ácido 3 β -hidroxiandroster-5-en-17 β -carboxílico (73) en 0,5 ml de piridina anhidra y se agregaron 0,5 ml de anhídrido acético. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 hs y se volcó sobre 10 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 10%. Luego de 10 minutos de agitación, se extrajo con cloruro de metileno (2x40 ml). El extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad, se secó y se evaporó el solvente. El análisis por ccd (sistema

12) indicó más de un 50% de conversión del ácido de partida (73) en el anhídrido mixto (77).

- Acido 3 β -acetoxiandroster-5-en-17 β -carboxílico (74)

Se disolvieron 100 mg de ácido 3 β -hidroxiandroster-5-en-17 β -carboxílico (73) en 10 ml de ácido acético a 60°C. La solución se calentó a reflujo durante 72 hs y se volcó sobre agua (50 ml). El producto se extrajo con cloruro de metileno (2x50 ml) y el extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvieron 95 mg (84%) del compuesto 74 que resultó puro por ccd (sistema: 12). Se recrystalizó de etanol dando un p.f. 248-250°C.

IR (cm⁻¹): 3300-2400 (O-H, ácido), 1735 (C=O, éster), 1710 (C=O, ácido).

RMN-¹H, ppm: 0,76 (s, 3H, CH₃-18), 1,04 (s, 3H, CH₃-19), 2,05 (s, 3H, CH₃CO₂-), 4,68 (b.a., 1H, H-3), 5,45 (m, 1H, H-6), 9,90 (b.a., 1H, -CO₂H).

RMN-¹³C (Cl₃CD + MeOD), ppm: 38,0 (C-1), 27,7 (C-2), 74,0 (C-3), 38,0 (C-4), 139,5 (C-5), 122,1 (C-6), 31,8 (C-7 o C-8), 32,0 (C-8 o C-7), 49,9 (C-9), 36,9 (C-10), 20,9 (C-11), 36,6 (C-12), 43,8 (C-13), 56,1 (C-14), 24,5 (C-15), 23,5 (C-16), 55,0 (C-17), 13,1 (C-18), 19,2 (C-19), 177,3 (C-20), 21,3 (CH₃CO₂-), 170,7 (CH₃CO₂-).

EM, m/z (%): 300 (M - AcOH, 100), 285 (M - AcOH - CH₃, 31), 213 (M - AcOH - anillo D, 4).

- Cloruro de 3 β -acetoxiandroster-5-en-17 β -carboxililo (75).

Se suspendieron 180 mg del compuesto 74 en 2 ml de benceno anhidro y se agregó una solución de 1 ml de cloruro de oxalilo en 2 ml de benceno anhidro. Se dejó tapado a temperatura ambiente y en reposo durante 2 hs. Se destiló a presión reducida hasta sequedad y se completó el secado empleando alto vacío.

El compuesto se utilizó sin posterior purificación.

IR (cm^{-1}): 1795 (C=O, cloruro de ácido), 1735 (C=O, éster).

RMN- ^1H , ppm: 0,74 (s, 3H, CH_3 -18), 0,97 (s, 3H, CH_3 -19), 1,97 (s, 3H, CH_3CO_2 -),
2,81 (t, J=9Hz, 1H, H-17), 4,55 (b.a., 1H, H-3), 5,30 (m, 1H, H-6).

EM, m/z (%): 318 (M - AcOH, 100), 303 (M - AcOH - CH_3 , 21), 267 (M - AcOH - CH_3 - ClH, 9), 255 (M - AcOH - Cl, 10).

- 3 β -Acetoxipregn-5-en-20-ona (76).

Método A:

a) Preparación del ioduro de metilmagnesio: en un tubo de 20 cm de largo y 10 mm de diámetro con un esmeril macho $\text{\text{N}^\circ}$ 14/26, se colocaron 15 mg (0,63 mmoles) de magnesio (previamente desengrasado con éter etílico) y una barrita magnética. Todo el conjunto se secó en estufa a 110°C durante una hora. Se tapó el tubo con un tapón de látex y se hizo vacío en su interior mediante una aguja que atravesaba el tapón. Una vez retirada la aguja, se inyectó 1 ml de éter etílico anhidro y luego 33 μl (0,53 mmoles) de ioduro de metilo (secado sobre pentóxido de fósforo durante 24 hs). Se agitó durante 24 hs a temperatura ambiente obte-

niéndose finalmente una solución turbia de color gris claro.

b) Preparación del ioduro manganoso¹⁰²: se colocaron en un tubo 550 mg de manganeso en polvo y 2,54 g de iodo. Se tapó el balón con un tapón de látex y se hizo vacío en su interior mediante una aguja. Se inyectaron 10 ml de éter etílico anhidro y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 hs. Después de ese período se observó la desaparición del color metálico del manganeso y la formación de un sólido de color rosado. Se inyectó nitrógeno y se extrajo el éter etílico con una jeringa. Se hizo vacío en el interior del balón y se guardó en la oscuridad.

c) Preparación del ioduro de metilmanganeso: se colocaron 170 mg (0,55 mmoles) de ioduro manganoso y una barrita magnética en un balón que se tapó con un tapón de látex. Se hizo vacío mediante una aguja y se colocaron 2 ml de éter etílico anhidro. Se inyectó el reactivo de Grignard preparado según se indica en a) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 hs. Se diluyó el reactivo formado con 2 ml de éter etílico anhidro.

d) Desarrollo de la reacción: a la solución recién preparada de ioduro de metilmanganeso se agregaron 190 mg (0,50 mmoles) de cloruro de 3 β -acetoxiandroster-5-en-17 β -carboxililo (75) disuelto en 2 ml de benceno anhidro. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 18 hs y luego se volcó sobre 20 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico (4%). El producto se extrajo con cloroformo (2x30 ml) y el extracto se lavó con agua y se secó.

El residuo obtenido al evaporarse el solvente mostró por ccd (sistema: 13)

una muy baja conversión en el compuesto buscado.

Método B:

Se empleó el equipo que se indica en la figura 1b de la página 74.

a) Preparación del ioduro de metilmagnesio: se colocaron 15 mg (0,63 mmoles) de magnesio (previamente desengrasado con éter etílico) en el fondo de un tubo kitasato de aproximadamente 10 ml de capacidad con un esmeril $\text{F } 10/30$. Se agregó una barrita magnética en el interior del tubo y se secó el conjunto en una estufa a 110°C durante una hora.

Al mismo tratamiento de secado se sometió un tubo de vidrio de 20 cm de largo y 10 mm de diámetro con esmeril $\text{F } 14/26$ (similar a los tubos en los que viene envasado el ioduro de metilo radiactivo), un adaptador de esmeril $\text{F } 14/26$ a $\text{F } 10/30$ y una barrita magnética. Una vez que se completó el secado se siliconaron los esmeriles y se armó el equipo como se indica en la figura 1b. En este equipo el diámetro de la barrita magnética superior es ligeramente mayor que el diámetro interno del esmeril $\text{F } 10/30$. Además el magnesio queda adentro del tubo kitasato.

Se hizo vacío en el interior del equipo mediante una aguja que atravesaba el tapón de látex de la salida lateral del tubo kitasato. Una vez retirada la aguja se inyectó a través del mismo tapón una solución de $35\ \mu\text{l}$ (0,56 mmoles) de ioduro de metilo (secado sobre pentóxido de fósforo durante 24 hs) disuelto en 1 ml de éter etílico anhidro (destilado sobre sodio e hidruro de litio y aluminio inmediatamente antes de ser usado).

La mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente.

b) Preparación del dimetilcadmio: en un ambiente de nitrógeno anhidro, se destapó el tubo kitasato y se colocó en la boca del mismo un embudo pequeño con esmeril $\text{F } 10/30$. Se volcaron dentro del tubo 220 mg (1,21 mmoles) de cloruro de cadmio finamente pulverizado y secado en estufa a 110°C durante 24 hs. Se tapó el tubo con un tapón con esmeril $\text{F } 10/30$ siliconado y se agitó 2 hs a temperatura ambiente.

c) Desarrollo de la reacción: se disolvieron 190 mg (0,50 mmoles) de cloruro de 3β -acetoxiandroster-5-en-17 β -carboxililo (75) en 2 ml de benceno anhidro. La solución se inyectó en el tubo kitasato a través del tapón de látex de su salida lateral. La suspensión resultante se agitó 18 hs a temperatura ambiente y luego se calentó cuidadosamente a 50°C durante una hora.

Se sacó el tapón de vidrio y se agregaron, gota a gota y enfriando, 0,5 ml de ácido clorhídrico (c) y luego 2 ml de agua.

Se extrajo el producto con cloruro de metileno (2x20 ml) y se lavó la fase orgánica con agua hasta neutralidad, se secó y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de silicagel eluyendo con cloroformo. Se obtuvieron 70 mg (39%) del compuesto 76, homogéneo por ccd (sistema: 13). Recristalizado de etanol dio p.f. $147-149^{\circ}\text{C}$.

IR (cm^{-1}): 1735 (C=O, éster), 1705 (C=O, cetona), 1240 (C-O).

RMN- ^1H , ppm: 0,64 (s, 3H, CH_3 -18), 1,03 (s, 3H, CH_3 -19), 2,03 (s, 3H, CH_3CO_2 -), 2,14 (s, 3H, CH_3 -21), 4,60 (b.a., 1H, H-3), 5,42 (m, 1H, H-6).

EM, m/z (%): 298 (M - AcOH, 100), 283 (M - AcOH - CH_3 , 30).

E - SINTESIS TOTAL DE $|21-^{14}\text{C}|$ 3 β -HIDROXI-5 β -PREGN-8(14)-EN-20-ONA

E1 - DEGRADACION DE LA CADENA LATERAL DEL ACIDO BILIAR AL ACIDO ETIANICO

Los compuestos correspondientes a esta primera etapa de la síntesis son los que se indican a continuación y su preparación ya se detalló previamente.

- Acido 3 α ,7 α -diacetoxi-5 β -colan-24-oico (48): método D, pág.155.
- Diacetato de 24-nor-5 β -col-22-eno-3 α ,7 α -diol (49): pág.155.
- 24-Nor-5 β -col-20(22)-eno-3 α ,7 α -diol (50): pág. 157.
- Diacetato de 24-nor-5 β -col-20(22)-eno-3 α ,7 α -diol (51): pág.159.
- 3 α ,7 α -Diacetoxi-5 β -pregnan-20-ona (47): método A, pág.160.
- 3 α ,7 α ,21-Triacetoxi-5 β -pregnan-20-ona (52): pág.164.
- 3 α ,7 α -Dihidroxi-5 β -androstán-17 β -carboxilato de metilo (57): pág.165.

E2 - DESHIDRATAACION DEL HIDROXILO DE CARBONO 7 E ISOMERIZACION DEL DOBLE ENLACE FORMADO A LA POSICION 8(14)

- 7 α -Hidroxi-3 α -metilsuccinoxi-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (78).

Se disolvieron 220 mg de anhídrido succínico en 5 ml de piridina anhidra y a la solución se agregaron 100 mg de 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (57). La mezcla se calentó a reflujo durante una hora y se volcó sobre 20 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 15%. Luego de 10 minutos de agitación a temperatura ambiente, se extrajo el producto con acetato de etilo (3x50 ml). La fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad y se secó. Por

evaporación del solvente se obtuvo un residuo que se suspendió en metanol y se metiló con diazometano según la técnica antes descripta. El jarabe final se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: cloroformo y cloroformo-etanol 95:5). Se obtuvieron 99 mg (75%) del compuesto 78, cristalino y homogéneo por ccd (sistema: 7). Se recrystalizó de etanol resultando ser sumamente higroscópico. P.f. 118-119°C.

IR (cm^{-1}): 3400 (O-H), 1735 (C=O).

RMN- ^1H , ppm: 0,66 (s, 3H, CH_3 -18), 0,93 (s, 3H, CH_3 -19), 2,62 (s, 4H, $-\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-$), 3,70 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3,72 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3,88 (b.a., 1H, H-7), 4,60 (b.a., 1H, H-3).

RMN- ^{13}C : ver tabla 10, pág 124.

EM, m/z (%): 332 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$, 15), 314 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4 - \text{H}_2\text{O}$, 100), 300 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4 - \text{CH}_3\text{OH}$, 7), 299 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4 - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$, 82), 255 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4 - \text{H}_2\text{O} - \text{CL}$, 33), 254 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4 - \text{H}_2\text{O} - \text{HCO}_2\text{CH}_3$, 6).

- 3 α -Metilsuccinoksi-5 β -androst-8(14)-en-17 β -carboxilato de metilo (80) y 3 α -metilsuccinoksi-5 β -androst-7-en-17 β -carboxilato de metilo (79).

Se disolvieron 100 mg del compuesto 78 en 10 ml de acetona anhidra (secada sobre filtros moleculares). Se agregaron 400 mg de cloruro de zinc anhidro (fundido justo antes de ser usado) y la solución resultante se destiló hasta obtener un jarabe (sin llevar a sequedad). Se repusieron 10 ml de acetona anhidra y se volvió a destilar. El proceso se repitió 3 veces al cabo de las cuales, después

de reponer 10 ml de acetona, se agregaron 400 mg de cloruro de zinc anhidro. La secuencia de agregado de acetona y destilación se repitió 5 veces más. El jara-be amarillo final se trató con 10 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 15% y el producto se extrajo con acetato de etilo (2x50 ml). El extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad y luego de secarlo se destiló el solvente. El residuo se suspendió en metanol y se metiló con diazometano según la técnica descrita previamente. El esteroide metilado se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: tolueno-acetato de etilo 9:1). Se aislaron 77 mg (80%) de una mezcla de las olefinas 79 y 80 que no se pudo separar por ccd.

Es conveniente seguir el desarrollo de la reacción por ccd pues el número de secuencias de agregado de acetona y destilación puede variar.

IR (cm^{-1}): 1735 (C=O).

RMN- ^1H , ppm: 0,54 (s, CH_3 -18 de 79), 0,82 (s, CH_3 -19 de 80), 0,84 (s, CH_3 -18 de 80). 0,93 (s, CH_3 -19 de 79), 2,60 (s, $-\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-$), 3,69 (s, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3,71 (s, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4,60 (b.a., H-3), 5,10 (b.a., H-7).

- 3 α -Metilsuccinoksi-5 β -androster-8(14)-en-17 β -carboxilato de metilo (80).

a) Separación de la mezcla de olefinas 79 y 80.

La mezcla de las olefinas 79 y 80 obtenida como resultado de la reacción de deshidratación con cloruro de zinc se separó por cromatografía líquida de alta resolución utilizando como solvente metanol-agua (9:1). Se empleó un flujo de

3 ml/min y una presión de 16 Kpsi. Se colectó el compuesto 79 a los 12,5 minutos y el compuesto 80 a los 14 minutos.

b) Isomerización del compuesto 79.

Se colocaron 50 mg del compuesto 79 en un tubo de vidrio Pyrex de 30 cm de largo y 0,1 cm de espesor enfriado a -10°C . Sobre el sólido se volcaron 2 ml de dióxido de azufre a esa misma temperatura, preparado según se indica en la página 173. El tubo se cerró y se colocó en un horno a temperatura ambiente. Luego de 10 minutos se calentó el horno lentamente hasta 100°C y se lo mantuvo así durante 36 hs. Se enfrió lentamente la mezcla hasta -10°C , se abrió el tubo y se volcó su contenido en un balón donde rápidamente se evaporó el exceso de reactivo. Se lavó el tubo con cloroformo y las soluciones de lavado se juntaron en el balón. Se evaporó el solvente y el jarabe residual se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: tolueno-acetato de etilo 9:1). Se obtuvieron 34 mg (68%) de la olefina 80 que resultó homogénea por ccd (sistema: 10).

Las características espectroscópicas y el punto de fusión de los productos aislados por ambos procedimientos eran los mismos.

IR (cm^{-1}): 1735 (C=O).

RMN- ^1H , ppm: 0,82 (s, 3H, CH_3 -19), 0,84 (s, 3H, CH_3 -19), 2,62 (s, 4H, $-\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-$), 3,69 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3,71 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4,75 (b.a., 1H, H-3).

RMN- ^{13}C : ver tabla 10, pág. 124.

EM, m/z (%): 446 (M, 3), 415 (M - CH_3OH , 3), 314 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$, 96), 299 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$ - CH_3 , 81), 255 (M - $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$ - CL, 16), 57 (100).

- 3 α -Hidroxi-5 β -androst-8(14)-en-17 β -carboxilato de metilo (81).

Una mezcla de 100 mg del compuesto 80 y 50 ml de solución de hidróxido de potasio en etanol (2%) se calentó a reflujo durante 6 hs. Luego se volcó sobre 20 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 20% y se extrajo el producto con acetato de etilo (3x50 ml). El extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se aisló un residuo que se suspendió en 10 ml de metanol y se metiló con diazometano según la técnica descripta. El sólido resultante se purificó por ccd preparativa de silicagel (solvente de desarrollo: cloruro de metileno-metanol 98:2). Se obtuvieron 65 mg (87%) del compuesto 81, que resultó homogéneo por ccd (sistema: 11). Por recristalización de metanol dio p.f. 126-127°C.

IR (cm^{-1}): 3400 (O-H), 1735 (C=O).

RMN- ^1H , ppm: 0,81 (s, 3H, CH_3 -19), 0,83 (s, 3H, CH_3 -18), 3,60 (b.a., 1H, H-3), 3,69 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$).

RMN- ^{13}C : ver tabla 10, pág. 124.

EM, m/z (%): 332 (M, 20), 314 (M - H_2O , 100), 299 (M - H_2O - CH_3 , 91), 255 (M - H_2O - CL, 10), 254 (M - H_2O - HCO_2CH_3 , 7).

E3 - INVERSION DE LA CONFIGURACION DEL CARBONO 3.- 3 α -Tosiloxi-5 β -androster-8(14)-en-17 β -carboxilato de metilo (82).

Se disolvieron 50 mg del compuesto 81 en 5 ml de piridina anhidra y se agregaron 110 mg de cloruro de p-toluensulfonilo (recientemente recristalizado). La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 hs y luego se volcó sobre 15 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 18%. El producto se extrajo con cloroformo y la fase clorofórmica se lavó con agua hasta neutralidad, se secó y se destiló el solvente. El residuo se purificó por ccd preparativa (solvente de desarrollo: cloruro de metileno). Se obtuvieron 54 mg (74%) del compuesto 82 con p.f. 56-58°C

IR (cm^{-1}): 1730 (C=O), 1600 (C=C).

RMN- ^1H , ppm: 0,78 (s, 3H, CH_3 -19), 0,83 (s, 3H, CH_3 -18), 2,46 (s, 3H, CH_3 - C_6H_4 -), 3,69 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4,50 (b.a., 1H, H-3), 7,25-7,85 (m, 4H, sistema aromático).

RMN- ^{13}C : ver tabla 10, pág. 124.

EM, m/z (%): 314 (M - TsOH, 2), 43 (100).

- 3 β -Formiloxi-5 β -androster-8(14)-en-17 β -carboxilato de metilo (83).

Se disolvieron 50 mg del compuesto 82 en 2,5 ml de N,N-dimetilformamida. La solución se mantuvo en un balón tapado a 75-76°C durante 50 hs. Se agregaron 25 ml de agua y se extrajo el producto con cloruro de metileno (2x50 ml). El extracto orgánico se lavó repetidas veces con agua (10x20 ml) y se secó. Por eva-

poración del solvente se obtuvo un jarabe que se recristalizó de metanol. Se aislaron 23,3 mg (63%) del compuesto 83 como un sólido cristalino, homogéneo por ccd (sistema: 5) de p.f. 150-152°C.

IR (cm^{-1}): 1730 (C=O).

RMN- ^1H , ppm: 0,86 (s, 6H, CH_3 -18 y CH_3 -19), 3,69 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 5,25 (b.a., 1H, H-3), 8,07 (s, 1H, HCO_2^-).

RMN- ^{13}C : ver tabla 10, pág. 125.

EM, m/z (%): 360 (M, 82), 345 (M - CH_3 , 27), 314 (M - HCO_2H , 73), 299 (M - CH_3 - HCO_2H , 46), 255 (M - HCO_2H - CL, 11), 147 (100).

E4 - OBTENCION DEL 20-CETO PREGNANO A PARTIR DEL ACIDO ETIANICO

- Acido 3 β -hidroxi-5 β -androst-8(14)-en-17 β -carboxílico (84).

Se disolvieron 20 mg del compuesto 83 en 20 ml de solución de hidróxido de potasio en etanol (2%). La solución se calentó a reflujo durante 2 hs y luego se volcó sobre 10 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 20%. El producto se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml) y el extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad y se secó. Después de evaporar el solvente se aislaron 17 mg (96%) del compuesto 84 como un sólido cristalino que se usó sin purificación previa.

IR (cm^{-1}): 3500-2700 (O-H, ácido), 3300 (O-H, alcohol), 1715 (C=O).

- Acido 3 β -acetoxi-5 β -androst-8(14)-en-17 β -carboxílico (85).

Se acetilaron 16,5 mg del compuesto 84 con la misma técnica indicada en la página 176 para el ácido 3 β -hidroxiandrost-5-en-17 β -carboxílico (73). Se aislaron 15,5 mg (83%) del compuesto 85, homogéneo por ccd (sistema: 1), que se usó sin purificar.

IR (cm^{-1}): 3400-2600 (O-H, ácido), 1730 (C=O, éster), 1715 (C=O, ácido).

RMN- ^1H , ppm: 0,83 (s, 3H, CH_3 -18), 0,85 (s, 3H, CH_3 -19), 2,06 (s, 3H, CH_3CO_2 -), 5,10 (b.a., 1H, H-3).

- ^{14}C 3 β -Acetoxi-5 β -pregn-8(14)-en-20-ona (86).

a) Obtención del cloruro de ácido.

Se suspendieron 15 mg del ácido 85 en 0,5 ml de benceno anhidro y se agregaron 0,5 ml de cloruro de oxalilo. La solución resultante se dejó tapada y a temperatura ambiente durante 2 hs. Se evaporó el solvente y se usó sin previa purificación.

IR (cm^{-1}): 1790 (C=O, cloruro de ácido), 1730 (C=O, éster).

b) Obtención del 20-ceto pregnano.

Se empleó el método B de la página 179 con las siguientes modificaciones. El equipo empleado es el que se indica en la figura 1a, con un tubo invertido que contenía en su interior (protegido por un cierre de vidrio) 1 mCi de ^{14}C ioduro de metilo de actividad específica 58 mCi/mmol.

b1) Preparación del ioduro de metilmagnesio radiactivo.

Se usaron 2 mg (0,08 mmoles) de magnesio.

Una vez armado el equipo y hecho vacío en su interior, se inyectó una solución de 1,7 μ l (0,027 mmoles) de ioduro de metilo anhidro (secado sobre pentóxido de fósforo) en 0,3 ml de éter anhidro (secado sobre sodio e hidruro de litio y aluminio y usado inmediatamente después de su destilación).

La mezcla se agitó durante 45 minutos (la reacción demoró aproximadamente 20 minutos en comenzar) y luego se enfrió sumergiendo el fondo del tubo kitasato en aire líquido. Con ayuda de un imán externo, se movió la barrita magnética ubicada en la parte superior del equipo, golpeando el cierre de vidrio hasta romperlo. Mientras se mantenía congelado el fondo del tubo kitasato, se flameó con una microllama el tubo invertido durante 15 minutos para facilitar el contacto de 0,017 mmoles de ioduro de metilo radiactivo con el medio de reacción. Se retiró el baño de aire líquido y se dejó que el sistema alcanzara la temperatura ambiente. Se continuó con la agitación durante una hora.

b2) Preparación del dimetilcadmio radiactivo.

Se repitió el procedimiento empleado en el método B parte b (pág. 180) pero con 18 mg (0,1 mmol) de cloruro de cadmio.

b3) Reacción del dimetilcadmio radiactivo con el cloruro de ácido.

Se aplicó el método B parte c (pág. 180) pero usando 15 mg (0,04 mmoles) del cloruro de 3 β -acetoxi-5 β -androst-8(14)-en-17 β -carboxililo en lugar del com-

puesto 75.

El producto final obtenido se purificó por ccd preparativa usando silica-gel como adsorbente (solvente de desarrollo: cloroformo-hexano 98:2). Se aislaron 5,05 mg (36%) del compuesto 86 como un sólido cristalino homogéneo por ccd (sistemas: 4, 5, 13 y 15).

Actividad específica del producto crudo: $1,97 \times 10^7$ dpm/mg.

Actividad específica del producto purificado: $2,25 \times 10^7$ dpm/mg o $8,05 \times 10^9$ dpm/mmol o 3,66 mCi/mmol.

IR (cm^{-1}): 1735 (C=O, éster), 1710 (C=O, cetona).

RMN- ^1H , ppm: 0,80 (s, 3H, CH_3 -18), 0,86 (s, 3H, CH_3 -19), 2,04 (s, 3H, CH_3CO_2 -), 2,12 (s, 3H, CH_3 -21), 5,10 (b.a., 1H, H-3).

- ^{14}C 3 β -Hidroxi-5 β -pregn-8(14)-en-20-ona (87).

Se disolvieron 4,9 mg del compuesto 86 en 10 ml de etanol y se agregaron 3 gotas de ácido sulfúrico (c). La mezcla se reflujo durante 24 hs y se volcó sobre 30 ml de agua. El producto se extrajo con acetato de etilo (3x30 ml) y se lavó el extracto orgánico con agua hasta neutralidad. Después de secarlo, se evaporó el solvente. El residuo se purificó por ccd preparativa usando silica-gel como adsorbente (solvente de desarrollo: cloroformo-etanol 99:1). Se obtuvieron 2,49 mg (58%) del compuesto 87 homogéneo por ccd (sistemas: 3 y 4). P.f. 118-120°C (lit. ⁴³ : 123°C).

Actividad específica del producto purificado: $2,54 \times 10^7$ dpm/mg o $8,02 \times 10^9$ dpm/mmol.

IR (cm^{-1}): 3350 (O-H), 1710 (C=O).

RMN- ^1H , ppm: 0,80 (s, 3H, CH_3 -18), 0,83 (s, 3H, CH_3 -19), 2,16 (s, 3H, CH_3 -21),
4,20 (b.a., 1H, H-3).

F - SINTESIS TOTAL DE $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -HIDROXI-5 β -PREGNAN-20-ONA

F1 - DEGRADACION DE LA CADENA LATERAL DEL ACIDO BILIAR AL ACIDO ETIANICO.

- Acido 3 α -acetoxi-5 β -colan-24-oico (88).

Se disolvieron 500 mg de ácido litocólico (42) en 3 ml de piridina anhidra y se agregaron 3 ml de anhídrido acético. La solución se dejó 24 hs a temperatura ambiente y se volcó sobre ácido clorhídrico acuoso (6 ml de HCl (c) en 40 ml de agua). El producto se extrajo con acetato de etilo (3x50 ml), se lavó el extracto orgánico con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvieron 560 mg de un producto puro por ccd (sistema: 12), que recrystalizado de etanol dio p.f. 165-166°C (lit ¹⁰³: 169°C). IR (cm⁻¹): 3400-2700 (O-H), 1735 (C=O, éster), 1710 (C=O, ácido).

- Acetato de 24-nor-5 β -col-22-en-3 α -ol (89).

Se trataron 800 mg (1,9 mmoles) del ácido 88 con 2,4 g (5,4 mmoles) de tetraacetato de plomo en las condiciones indicadas para el compuesto 48 (pág.155).

El extracto crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: tolueno). Se obtuvieron 450 mg (63%) del compuesto 89, homogéneo por ccd (sistema: 9). El producto recrystalizado de metanol dio p.f. 83,5-85°C.

IR (cm⁻¹): 1730 (C=O).

RMN-¹H, ppm: 0,68 (s, 3H, CH₃-18), 0,94 (s, 3H, CH₃-19), 1,03 (d, J=6Hz, 3H,

CH₃-21), 2,04 (s, 3H, CH₃CO₂-), 4,75 (b.a., 1H, H-3), 4,90 (m, 2H, CH₂-23), 5,70 (m, 1H, CH-22).

EM, m/z (%): 372 (M, 2), 357 (M - CH₃, 4), 317 (M - CL, 3), 312 (M - AcOH, 38), 297 (M - AcOH - CH₃, 13), 257 (M - AcOH - CL, 100).

- 24-Nor-5 β -col-20(22)-en-3 α -ol (90).

a) Purificación de la etilendiamina: se realizó con el mismo procedimiento indicado en el método B de la página 157.

b) Preparación del reactivo: se hicieron reaccionar 334 mg de alambre de litio con 11 ml de etilendiamina en la misma forma que se indica en la página 158.

c) Desarrollo de la reacción: se trataron 1,50 g del compuesto 89 con el reactivo preparado según b) en las mismas condiciones señaladas en el método B de la página 158.

El sólido cristalino resultante se recrystalizó de una mezcla de etanol-agua obteniéndose 1,17 g (88%) del compuesto 90 que resultó homogéneo por ccd (sistema: 6). P.f. 114-115°C.

IR (cm⁻¹): 3300 (O-H).

RMN-¹H, ppm: 0,52 (s, 3H, CH₃-18), 0,93 (s, 3H, CH₃-19), 1,58 (d, J=5Hz, 3H, CH₃-23), 1,62 (s, 3H, CH₃-21), 3,65 (b.a., 1H, H-3), 5,25 (b.a., 1H, CH-22).

EM, m/z (%): 330 (M, 14), 312 (M - H₂O, 2), 257 (M - H₂O - CL, 4).

- Acetato de 24-nor-5 β -col-20(22)-en-3 α -ol (91).

Se disolvieron 500 mg del alcohol 90 en 10 ml de una mezcla de anhídrido acético y piridina (1:1). El sistema se dejó a temperatura ambiente durante 24 hs y se volcó sobre 15 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 20%. La mezcla se agitó durante 15 minutos y se extrajo con cloruro de metileno (3x50 ml). El extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo que se recristalizó de etanol. Se aislaron 490 mg (87%) del acetato 91, homogéneo por ccd (sistema: 9) y de p.f. 104-105°C.

IR (cm⁻¹): 1740 (C=O).

RMN-¹H, ppm: 0,52 (s, 3H, CH₃-18), 0,94 (s, 3H, CH₃-19), 1,58 (d, J=6Hz, 3H, CH₃-23), 1,62 (s, 3H, CH₃-21), 2,04 (s, 3H, CH₃CO₂-), 4,70 (b.a., 1H, H-3), 5,25 (m, 1H, CH-22).

EM, m/z (%): 372 (M, 77), 357 (M - CH₃, 3), 312 (M - AcOH, 64), 297 (M - AcOH - CH₃, 97), 257 (M - AcOH - CL, 21), 82 (100).

- 3 α -Acetoxi-5 β -pregnan-20-ona (92).

Se ozonolizaron 500 mg de la olefina 91 en las mismas condiciones que se indicaron para el compuesto 51 (pág. 160).

El residuo final se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: tolueno-acetato de etilo 9:1). Se aislaron 385 mg (80%) del compuesto **92** homogéneo por ccd (sistema: 5). P.f. 101-102°C (lit.¹⁰⁴: 101-102°C).

IR (cm^{-1}): 1740 (C=O, éster), 1705 (C=O, cetona).

RMN-¹H, ppm: 0,61 (s, 3H, CH₃-18), 0,95 (s, 3H, CH₃-19), 2,04 (s, 3H, CH₃CO₂-), 2,12 (s, 3H, CH₃-21), 4,65 (b.a., 1H, H-3).

RMN-¹³C: ver tabla 9, pág. 118.

EM, m/z (%): 360 (M, 1), 300 (M - AcOH, 67), 285 (M - AcOH - CH₃, 14), 257 (M - AcOH - CL, 11), 43 (100).

- 3 α ,21-Diacetoxi-5 β -pregnan-20-ona (93).

Se disolvieron 700 mg (1,94 mmoles) del compuesto **92** en 30 ml de benceno y a la solución se agregaron 1,6 g (3,64 mmoles) de tetraacetato de plomo, 1,4 ml de metanol y 4,5 ml de eterato de trifluoruro de boro. La mezcla se trató con el mismo procedimiento que se indica en la página 164 para el compuesto **47**. El producto se extrajo con cloruro de metileno y el extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad, se secó y se evaporó el solvente. El residuo final se purificó por recristalización de etanol obteniéndose 600 mg (73%) del diacetato **93** como un sólido cristalino homogéneo por ccd (sistema: 5). P.f. 95-96°C (lit.¹⁰⁴: 97-98°C).

IR (cm^{-1}): 1740 (C=O, éster), 1710 (C=O, cetona).

RMN- ^1H , ppm: 0,64 (s, 3H, CH_3 -18), 0,94 (s, 3H, CH_3 -19), 2,04 (s, 3H, CH_3CO_2 -),
 2,18 (s, 3H, $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$), 4,60 (c_{AB} , $J=20\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$), 4,65
 (b.a., 1H, H-3).

RMN- ^{13}C : ver tabla 9 , pág. 119.

EM, m/z (%): 358 (M - AcOH, 4), 345 (M - $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, 70), 343 (M - AcOH - CH_3 ,
 1), 257 (M - AcOH - CL, 93), 75 (100).

- 3 α ,21-Dihidroxi-5 β -pregnan-20-ona (94).

Se trataron 400 mg del compuesto 93 en las mismas condiciones de hidrólisis y extracción del compuesto 52 indicadas en la parte a) de la página 165. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: cloruro de metileno-metanol 95:5). Se obtuvieron 230 mg (72%) del compuesto 94 como un producto cristalino y homogéneo por ccd (sistema: 7). P.f. 130-132°C (lit.¹⁰⁴: 152,5-153,5°C).

IR (cm^{-1}): 3300 (O-H), 1705 (C=O).

RMN- ^1H , ppm: 0,62 (s, 3H, CH_3 -18), 0,93 (s, 3H, CH_3 -19), 3,65 (b.a., 1H, H-3),
 4,18 (b.a., 2H, $-\text{CH}_2\text{OH}$).

RMN- ^{13}C : ver tabla 9 , pág. 119.

EM, m/z (%): 334 (M, 1), 316 (M - H_2O , 1), 303 (M - CH_2OH , 95), 301 (M - H_2O - CH_3 , 2), 257 (M - H_2O - CL, 100).

- 3 α -Hidroxi-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (95).

Se trató 1,0 g (3,0 mmoles) de la α -hidroxicetona 94 con 2,0 g (9,3 mmoles) de periodato de sodio de acuerdo con el procedimiento indicado en la página 165. parte b. Se aisló un sólido que se metiló según la técnica descrita previamente. Se obtuvieron 213 mg (91%) del éster 95 que se recrystalizó de metanol. P.f. 144-147°C (lit.¹⁰⁵ : 142-146°C).

IR (cm⁻¹): 3300 (O-H), 1740 (C=O).

RMN-¹H, ppm: 0,65 (s, 3H, CH₃-18), 0,93 (s, 3H, CH₃-19), 3,60 (b.a., 1H, H-3), 3,68 (s, 3H, -CO₂CH₃).

RMN-¹³C: ver tabla 9, pág.120.

EM, m/z (%): 316 (M - H₂O, 2), 302 (M - CH₃OH, 100), 287 (M - CH₃OH - CH₃, 70), 275 (M - CL, 4), 257 (M - CL - H₂O, 4).

F2 - INVERSION DE LA CONFIGURACION DEL CARBONO 3.

- 3 α -Tosiloxi-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (96).

Se tosilaron 140 mg del éster 95 según la técnica descrita para el compuesto 81 en la página 186. El residuo se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: cloroformo). Se obtuvieron 194 mg (95%) del producto buscado (96) que se recrystalizó de metanol dando un p.f. 120-121°C.

IR (cm⁻¹): 1735 (C=O), 1600 (C=C).

RMN-¹H, ppm: 0,64 (s, 3H, CH₃-18), 0,91 (s, 3H, CH₃-19), 2,46 (s, 3H, CH₃-C₆H₄-),

3,68 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4,45 (b.a., 1H, H-3), 7,30-7,80 (m, 4H, sistema aromático).

RMN- ^{13}C : ver tabla 9, pág. 120.

EM, m/z (%): 316 (M - TsOH, 100), 301 (M - TsOH - CH_3 , 88), 284 (M - TsOH - CH_3OH , 4), 257 (M - TsOH - CL, 37), 256 (M - TsOH - HCO_2CH_3 , 26).

- 3 β -Formiloxi-5 β -androstan-17 β -carboxilato de metilo (97).

Se invirtió la configuración del carbono 3 del compuesto 96 usando N,N-dimetilformamida en las condiciones indicadas para el compuesto 67 en la página 170. El extracto crudo se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: tolueno-acetato de etilo 95:5). Se aislaron 45 mg (61%) del producto formilado 97. Por recristalización de etanol dio p.f. 95-96°C.

RMN- ^1H , ppm: 0,66 (s, 3H, CH_3 -18), 0,99 (s, 3H, CH_3 -19), 3,68 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 5,20 (b.a., 1H, H-3), 8,08 (s, 1H, HCO_2 -).

RMN- ^{13}C : ver tabla 9, pág. 120.

EM, m/z (%): 316 (M - HCO_2H , 100), 303 (M - CL, 4), 301 (M - HCO_2H - CH_3 , 41), 257 (M - HCO_2H - CL, 12).

F3 - OBTENCION DEL 20-CETO PREGNANO A PARTIR DEL ACIDO ETIANICO.

- Acido 3 β -hidroxi-5 β -androstan-17 β -carboxílico (98).

Se usó el mismo método indicado en la página 187 para el compuesto 83 con 100 mg del éster 97. El residuo obtenido después de la extracción con acetato

de etilo, se recrystalizó de etanol aislándose 79 mg (90%) del ácido 98 que dio p.f. 239-241°C (lit.¹⁰⁶: 226-228°C).

IR (cm^{-1}): 3500-2700 (O-H, ácido), 3350 (O-H, alcohol), 1720 (C=O).

RMN-¹H, ppm: 0,88 (s, 3H, CH₃-18), 1,02 (s, 3H, CH₃-19), 4,30 (b.a., 1H, H-3).

EM, m/z (%): 302 (M - H₂O, 5), 287 (M - H₂O - CH₃, 3), 45 (100).

- Acido 3 β -acetoxi-5 β -androstan-17 β -carboxílico (99).

Se acetilaron 220 mg del ácido 98 con ácido acético, empleando la misma técnica usada para el compuesto 73 (página 176). El producto final se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: cloroformo). Se obtuvieron 190 mg del ácido 99 que se recrystalizó de etanol dando p.f. 170-172°C.

RMN-¹H, ppm: 0,73 (s, 3H, CH₃-18), 0,95 (s, 3H, CH₃-19), 2,07 (s, 3H, CH₃CO₂-), 5,10 (b.a., 1H, H-3).

- 3 β -Acetoxi-5 β -pregnan-20-ona (100).

a) Obtención del cloruro de ácido.

Se suspendieron 180 mg (0,50 mmoles) del ácido 99 en 2 ml de benceno anhidro. Se agregó 1 ml de cloruro de oxalilo y se dejó tapado y a temperatura ambiente durante 2 hs. Se evaporó el solvente a sequedad y se usó sin previa purificación.

IR (cm^{-1}): 1795 (C=O, cloruro de ácido), 1730 (C=O, éster).

b) Obtención del 20-ceto pregnano.

Se hicieron reaccionar 190 mg (0,50 mmoles) del cloruro de ácido preparado según a) con dimetilcadmio, empleando la misma técnica utilizada para la síntesis del compuesto 76 en el método B de la página 179. El residuo aislado se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: cloroformo). Se obtuvieron 73 mg (41%) de la metilcetona 100, pura por ccd (sistema: 5). Recristalizada de etanol dio p.f. 120-121°C (lit.¹⁰⁷: 121°C).

IR (cm^{-1}): 1740 (C=O, éster), 1705 (C=O, cetona).

RMN-¹H, ppm: 0,62 (s, 3H, CH₃-18), 0,98 (s, 3H, CH₃-19), 2,06 (s, 3H, CH₃CO₂-), 2,12 (s, 3H, CH₃-21), 5,10 (b.a., 1H, H-3).

EM, m/z (%): 360 (M, 1), 300 (M - AcOH, 100), 285 (M - AcOH - CH₃, 22), 257 (M - AcOH - CL, 11).

- [21-¹⁴C] 3β-Acetoxy-5β-pregnan-20-ona (100).

a) Obtención del cloruro de ácido.

Se preparó usando las mismas cantidades y en las mismas condiciones que se indicaron para la obtención del cloruro de ácido en la preparación de la metilcetona 100 no radiactiva.

b) Obtención del 20-ceto pregnano.

Se empleó el equipo indicado en la figura 1a de la página 74.

b1) Preparación del yoduro de metilmagnesio radiactivo.

Se aplicó la técnica indicada en la página 189 para la preparación del io-

duro de metilmagnesio no radiactivo, con las siguientes modificaciones.

Luego de armado el equipo con los 15 mg de magnesio en su interior y de haber hecho vacío en el sistema, se inyectó una solución de 20 μ l de yoduro de metilo anhidro (secado sobre pentóxido de fósforo) en 1 ml de éter anhidro (secado sobre sodio y sobre hidruro de litio y aluminio y destilado antes de usar). Se mantuvo con agitación durante 30 minutos, lapso durante el cual se consumió parte del magnesio y se formó una solución de color gris claro.

Se congeló el medio de reacción sumergiendo el fondo del tubo kitasato en aire líquido. Con ayuda de un imán externo se movió la barrita magnética de la parte superior del equipo de tal modo de romper el cierre de vidrio del tubo invertido que contenía el yoduro de metilo radiactivo. Se inyectaron 13 μ l de yoduro de metilo no radiactivo y se calentó el tubo invertido con una microllama durante 15 minutos. Se dejó llegar el sistema a temperatura ambiente y se continuó con la agitación durante 30 minutos. Finalizado ese tiempo se había consumido prácticamente todo el magnesio.

b2) Preparación del dimetilcadmio radiactivo.

Se repitió el método B parte b) de la página 180, empleando la misma cantidad de cloruro de cadmio molido y anhidro (secado durante un día a 110°C).

b3) Reacción del dimetilcadmio radiactivo con el cloruro de ácido.

Se empleó el método B parte c) de la página 180 pero usando 180 mg del cloruro de 3 β -acetoxi-5 β -androstan-17 β -carboxililo en lugar del cloruro de ácido 75.

Se aislaron 170 mg de producto sólido cuya actividad específica era $8,90 \times 10^6$ dpm/mg y que se purificó por cromatografía en columna de silicagel (solvente de elución: cloroformo). Se obtuvieron 68 mg (41%) del compuesto buscado (100), homogéneo por ccd (sistema: 5). Por recristalización de etanol dio p.f. 119-120°C (lit.¹⁰⁷: 121°C).

Actividad específica: 1°recristalización (etanol): $8,75 \times 10^6$ dpm/mg ó $3,15 \times 10^9$ dpm/mmol ó 1,43 mCi/mmol.

2°recristalización (etanol): $8,72 \times 10^6$ dpm/mg ó $3,14 \times 10^9$ dpm/mmol ó 1,42 mCi/mmol.

Las características espectroscópicas fueron coincidentes con las del compuesto no radiactivo.

- $|21-^{14}\text{C}|$ 3 β -Hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (19).

Se disolvieron 5,0 mg de $|21-^{14}\text{C}|$ 3 β -acetoxi-5 β -pregnan-20-ona (100) en 10 ml de etanol y se agregaron 3 gotas de ácido sulfúrico (c). La solución se calentó a reflujo durante 24 hs, se volcó sobre 30 ml de agua y se extrajo con cloruro de metileno. El extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo que se purificó por ccd preparativa de silicagel (solvente de desarrollo: cloroformo-etanol 98:2).

Actividad específica: $10,12 \times 10^6$ dpm/mg ó $3,22 \times 10^9$ dpm/mmol ó 1,46 mCi/mmol.

IR (cm^{-1}): 3250 (O-H), 1700 (C=O).

RMN-¹H, ppm: 0,62 (s, 3H, CH₃-18), 0,97 (s, 3H, CH₃-19), 2,11 (s, 3H, CH₃-21),

4,13 (b.a., 1H, H-3).

EM, m/z (%): 318 (M, 57), 303 (M - CH₃, 24), 300 (M - H₂O, 94), 285 (M - H₂O - CH₃, 30), 275 (M - CL, 5), 260 (M - CH₃ - CL, 12), 257 (M - H₂O - CL, 21), 43 (100).

RESUMEN.

La biosíntesis de los glicósidos cardenólidos ha sido estudiada en sus aspectos primarios y se conoce muy poco acerca de la hidroxilación en posición 14 con configuración β . Hubo varias hipótesis para este mecanismo que aún no ha sido aclarado. Debido a que existían datos contradictorios relacionados con la participación de un doble enlace en posición 8(14), se decidió sintetizar e inocular $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregn-8(14)-en-20-ona. Simultáneamente se desarrolló la síntesis de $[21-^{14}\text{C}]$ 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona, que es un precursor conocido del camino biosintético de cardenólidos, con el fin de usarlo como control en los ensayos de inoculación en plantas del género *Digitalis*.

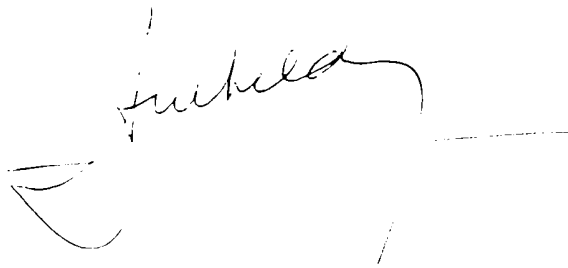
Para preparar ambos compuestos se usaron ácidos biliares como material de partida porque además de presentar las características estructurales necesarias para realizar las síntesis, resultaron ser materias primas económicas y fácilmente accesibles. Sobre los esteroides de partida se efectuaron las siguientes modificaciones:

- 1) Degradación de la cadena lateral del ácido biliar a una cadena de tipo ácido etiánico.
- 2) Inversión de la configuración del carbono 3.
- 3) Deshidratación del hidroxilo de carbono 7 e isomerización del doble enlace formado a la posición 8(14). (Esta modificación sólo se aplicó en una de las síntesis).

4) Construcción de una cadena lateral del tipo 20-ceto pregnano a partir de un ácido etiánico.

El sustrato a investigar se administró a plantas de *D. purpurea* no siendo incorporado por las mismas.

Como fue notoria la falta de datos de RMN-¹³C de los compuestos 5 β -esteroidales sintetizados, se asignaron los espectros de una serie de esteroides de este tipo que están estructuralmente relacionados. Estos se obtuvieron como intermedios en los caminos de síntesis, se adquirieron comercialmente o se prepararon especialmente para el estudio. Con los valores obtenidos se analizó la influencia de los cambios configuracionales y funcionales en el carbono 3, de la introducción de un doble enlace en la posición 8(14) y de la presencia de diferentes cadenas laterales.


Mónica Deluca

BIBLIOGRAFIA

- 1 a. H. Lichti, C. Tamm y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 39, 1933 (1956).
J.H. Russell, O. Schindler y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 44, 1315 (1961).
b. P. Studer, S.K. Pavanaram, C.R. Gavilanes, H. Linde y K. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, 46, 23 (1963).
- 2 C.E. Nativelle, *J. Pharmacol.*, 9, 255 (1869).
- 3 M. Cloetta, *Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, 88, 115 (1920).
- 4 A. Windaus y C. Fraese, *Ber. dtsh. chem. Ges.*, 58, 2503 (1925).
- 5 A. Windaus y G. Schwarte, *Ber. dtsh. chem. Ges.*, 58, 1515 (1925).
- 6 F. Kraft, *Arch. Pharm.*, 250, 118 (1912).
- 7 S. Smith, *J. Chem. Soc.*, 508 (1930).
- 8 *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds* (Editor: S. Coffey), Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Vol. 2 parte D.
- 9 P.A. Tavormina, M.H. Gibbs y J.W. Huff, *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 4498 (1956).
- 10 E. Ramstadt y J.L. Beal, *Chem. Ind. (London)*, 177 (1960).
- 11 E. Leete y H. Gregory, *Chem. Ind. (London)*, 1242 (1960).
- 12 E. Leete, H. Gregory y E. Gros, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 3475 (1965).
- 13 R. Tschesche, *Fortschr. Chem. Org. Naturstoff.*, 12, 131 (1955).
- 14 R. Tschesche, *Angew. Chem.*, 73, 727 (1961).
- 15 E. Gros y E. Leete, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 3479 (1965).
- 16 R. Tschesche y G. Lilienweiss, *Z. Naturforsch.*, 19b, 265 (1964).

- 17 J.V. Euw y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 47, 711 (1964).
- 18 R. Tschesche y B. Brassat, *Z. Naturforsch.*, 21b, 894 (1966).
- 19 E. Caspi, D.O. Lewis, D.M. Piatak, K.V. Thimann y A. Winter, *Experientia*, 22, 506 (1966).
- 20 E. Caspi y D.O. Lewis, *Science*, 156, 519 (1967).
- 21 H.H. Sauer, R.D. Bennett y E. Heftmann, *Naturwissenschaften*, 54, 226 (1967).
- 22 H.H. Sauer, R.D. Bennett y E. Heftmann, *Phytochemistry*, 6, 1521 (1967).
R.D. Bennett, H.H. Sauer y E. Heftmann, *Phytochemistry*, 7, 41 (1968).
- 23 E. Caspi y G.M. Hornby, *Phytochemistry*, 7, 423 (1968).
- 24 R. Tschesche, R. Hombach, H. Scholten y M. Peters, *Phytochemistry*, 9, 1505 (1970).
- 25 R. Tschesche, H. Hulpke y H. Scholten, *Z. Naturforsch.*, 22b, 677 (1967).
- 26 R. Tschesche, R. Becker y R. Hombach, *Z. Naturforsch.*, 23b, 1615 (1968).
- 27 R. Tschesche y R. Becker, *Z. Naturforsch.*, 25b, 107 (1970).
- 28 H.H. Sauer, R.D. Bennett y E. Heftmann, *Phytochemistry*, 7, 1543 (1968).
- 29 H.H. Sauer, R.D. Bennett y E. Heftmann, *Phytochemistry*, 8, 69 (1969).
- 30 H.H. Sauer, R.D. Bennett y E. Heftmann, *Phytochemistry*, 8, 839 (1969).
- 31 M. Hayano en *Oxygenases* (Editor: O. Hayaishi), Academic Press, N.Y., p. 182 (1962).
- 32 W. Charney y H.L. Herzog, *Microbial Transformations of Steroids*, Academic Press, N.Y., p. 18 (1967).

- 33 K.R. Varma y E. Caspi, *Phytochemistry*, 9, 1539 (1970).
- 34 K.D. Roberts, L. Bandy y S. Lieberman, *Biochemistry*, 8, 1259 (1969).
- 35 W. Charney y H.L. Herzog, *Microbial Transformations of Steroids*, Academic Press, N.Y., pp. 30, 31 (1967).
- 36 E. Caspi y D.O. Lewis, *Phytochemistry*, 7, 683 (1968).
- 37 K. Nakanishi, M. Koreeda, S. Sasaki, M.L. Chang y H.Y. Hsu, *Chem. Commun.*, 915 (1966).
- 38 M.N. Galbraith y D.H.S. Horn, *Chem. Commun.*, 905 (1966).
- 39 K. Heusler, J. Kalvoda, G. Anner y A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta*, 46, 352 (1963).
- 40 L. Canónica, F. Ronchetti y G. Russo, *Chem. Commun.*, 1675 (1970).
- 41 D.J. Aberhart, J.G. Lloyd-Jones y E. Caspi, *Phytochemistry*, 12, 1065 (1973).
- 42 R. Tschesche y U. Kleff, *Phytochemistry*, 12, 2375 (1973).
- 43 R. Tschesche y W. Führer, *Chem. Ber.*, 112, 2692 (1979).
- 44 Wieland, Schlichting y R. Jacobi, *Z. Physiol. Chem.*, 161, 80 (1926).
- 45 Ch. Meystre, L. Ehmann, R. Neher y K. Miescher, *Helv. Chim. Acta*, 28, 1252 (1945).
- 46 J.C. Beloeil, C. Esnault, M. Fétizon y R. Henry, *Steroids*, 35 (2), 281 (1979).
- 47 R.A. Sheldon y J.K. Kochi en *Organic Reactions* (editor en jefe: W.G. Dauben, John Wiley & Sons, Inc., vol. 19, p. 279 (1972).

- 48 A.S. Narula y S. Dev, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1733 (1969).
- 49 A.S. Narula y S. Dev, *Tetrahedron*, 27, 1119 (1971).
- 50 L. Reggel, S. Friedman y I. Wender, *J. Org. Chem.*, 23, 1136 (1958).
- 51 J.D. Cocker, H.B. Henbest, G.H. Phillips, G.P. Slater y D.A. Thomas, *J. Chem. Soc.*, 6 (1965).
- 52 S. Nakanishi, *J. Med. Chem.*, 7, 106 (1964).
- 53 J.T. Edward y J.M. Feland, *Can. J. Chem.*, 44, 1311 (1966).
- 54 H. Danielsson, P. Eneroth, K. Hellström y J. Sjövall, *J. Biol. Chem.*, 237, 3657 (1962).
- 55 L. Fieser y M. Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Inc., Vol. 1 (1967), p. 205.
- 56 A.K. Bose, B. Lal, W.A. Hoffman III y M.S. Manhas, *Tetrahedron Lett.*, 18, 1619 (1973).
- 57 F.C. Chang, *J. Org. Chem.*, 44, 4567 (1979).
- 58 F.C. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 2906 (1958).
- 59 F.C. Chang, N.F. Wood y W.G. Holton, *J. Org. Chem.*, 30, 1718 (1965).
- 60 F. Bödecker, *Ber. Chem.*, 53, 1852 (1920).
- 61 K. Yamasaki, *Z. Physiol. Chem.*, 233, 10 (1935).
- 62 K. Yamasaki y K. Takahashi, *Z. Physiol. Chem.*, 256, 21 (1938).
- 63 A.W. Devor y H.W. Marlow, *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 2101 (1946).
- 64 von E. Berner, A. Lardon y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 30, 1542 (1947).

- 65 D.H.R. Barton, *J. Chem. Soc.*, 1116 (1946).
- 66 J. Castells y G.D. Meakins, *Chem. Ind.*, 248 (1956).
- 67 E. Schwenk, B. Riegel, R.B. Moffett y E. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 549 (1943).
- 68 N. Bhacca y D. Williams, *Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry*, Holden Day, San Francisco (1966), p. 20.
- 69 A.W.D. Hudgell, J.H. Turnbull y W. Wilson, *J. Chem. Soc.*, 814 (1954).
- 70 H.O. House y T.M. Bare, *J. Org. Chem.*, 33, 943 (1968).
- 71 G. Cahiez, A. Masuda, D. Bernard y J.F. Normant, *Tetrahedron Lett.*, 3175 (1976).
- 72 G. Cahiez, D. Bernard y J.F. Normant, *Synthesis*, 130 (1977).
- 73 G. Cahiez, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1239 (1981).
- 74 H.B. Mac Phillamy y C.R. Scholz, *J. Biol. Chem.*, 178, 37 (1949).
- 75 H. Gilman y J.F. Nelson, *Rec. Trav. Chim.*, 55, 518 (1936).
- 76 W. Cole y P.L. Julian, *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 1369 (1945)., 67, 1369 (1945).
- 77 J.W. Blunt y J.B. Stothers, *Org. Magn.*, 9, 439 (1977).
- 78 M. Tsuda, E.J. Parish y G.J. Schroepfer, *J. Am. Chem. Soc.*, 44, 1282 (1979).
- 79 H. Eggert y C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, 46, 5399 (1981).
- 80 H.T. Andrew Cheung, L. Brown, J. Boutagy y R. Thomas, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1773 (1981).

- 81 G. Engelhardt, D. Zeigan y B. Schönecker, *J. Prakt. Chemie*, Band 320, 377 (1978).
- 82 H.J. Reich, M. Jautelat, M.T. Messe, F.J. Weigert y J.D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 7445 (1969).
- 83 S.Q.A. Rizvi y J.R. Williams, *J. Org. Chem.*, 46, 1127 (1981).
- 84 H. Eggert, C.L. Van Antwerp, N.S. Bhacca y C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, 41, 71 (1976).
- 85 H. Eggert y C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, 38, 3788 (1973).
- 86 H. Beierbeck, J.K. Saunders y J.W. Ap Simon, *Can. J. Chem.*, 55, 2813 (1977).
- 87 F.J. Evans y P.S. Cowley, *Phytochemistry*, 11, 2971 (1972).
- 88 M.S. Maier, *Estudio sobre rutas biosintéticas alternativas del anillo butenólido de cardenólidos en la planta D. purpurea*, Tesis, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (1985).
- 89 K.M. Wellman y C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 60 (1965).
- 90 W.L. Duax, J.F. Griffin y D.C. Rohrer, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 6705 (1981).
- 91 W.D. Cotterill y M.J.T. Robinson, *Tetrahedron*, 20, 765 (1964).
- 92 M.D. Gonzalez y G. Burton, *Org. Magn. Reson.*, 22, 586 (1984).
- 93 E.N. Trachtenberg, C. Byon y M. Gut, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 6145 (1977).
- 94 C. Romers, C. Altona, H.J.C. Jacobs y R.A.G. De Graaff, en *Terpenoids*

and Steroids, *Specialist Periodical Reports*, Royal Society of Chemistry, London, Vol. 4 (1974).

- 95 M. Maier, A.M. Seldes y E.G. Gros, *Resultados no publicados*.
- 96 C. Altona y H. Hirschmann, *Tetrahedron*, 26, 2173 (1970).
- 97 H. Lee, N.S. Bhacca y M.E. Wolff, *J. Org. Chem.*, 31, 2692 (1966).
- 98 H. Lee y M.E. Wolff, *J. Org. Chem.*, 32, 192 (1967).
- 99 C. Le Cocq y J. Lallemand, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 4, 150 (1981).
- 100 T. Kametani, K. Suzuki y H. Nemoto, *J. Org. Chem.*, 47, 2331 (1982).
- 101 von H.P. Sigg y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 39, 1507 (1956).
- 102 F. Ducelliez, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 13, 815 (1913).
- 103 *The Merck Index* (Editor: M. Windholz), Merck & Co. Rahway, N.J., USA, 9^o edición, p 5392.
- 104 M.L. Lewbart y V.R. Mattox, *J. Org. Chem.*, 28, 2001 (1963).
- 105 A. Lardon, *Helv. Chim. Acta*, 30, 597 (1947).
- 106 L. Ruzicka, Pl.A. Plattner y G. Balla, *Helv. Chim. Acta*, 25, 65 (1940).
- 107 R.E. Marker, O. Kamm y E.L. Wittle, *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 1841 (1937).

INDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1.....	74
Figura 2.....	115
Figura 3.....	121
Figura 4.....	128
Figura 5.....	134
Figura 6.....	134

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	103
Tabla 2.....	103
Tabla 3.....	104
Tabla 4.....	105
Tabla 5.....	105
Tabla 6.....	106
Tabla 7.....	106
Tabla 8.....	107
Tabla 9.....	117
Tabla 10.....	123